

Closing the gap: Measuring Identical Distances by Super- Resolution Microscopy and Single- Molecule FRET

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Julia Molle
aus Salzgitter

1. Referent: Professor Dr. Philip Tinnefeld
2. Referent: Professor Dr. Christoph Jacob
eingereicht am: 17.10.2018
mündliche Prüfung (Disputation) am: 22.01.2019

Druckjahr 2019

Veröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

- Julia Molle, Mario Raab, Susanne Holzmeister, Daniel Schmitt-Monreal, Dina Grohmann, Zhike He and Philip Tinnefeld: *Superresolution microscopy with transient binding*, Current opinion in biotechnology **39**, 8–16 (2016)
- M. Raab, I. Jusuk, J. Molle, E. Buhr, B. Bodermann, D. Bergmann, H. Bosse, P. Tinnefeld: *Using DNA origami nanorulers as traceable distance standards and nanoscopic benchmark structures*, Scientific Reports **8**, 1780 (2018)
- Julia Molle, Leonhard Jakob, Johann Bohlen, Mario Raab, Philip Tinnefeld and Dina Grohmann: *Towards Structural Biology with Super-Resolution Microscopy*, Nanoscale **eingereicht**

Tagungsbeiträge

- „Bridging the gap between super resolution and Förster Resonance Energy Transfer (FRET) on DNA Origami” **Vortrag**, Current Topics in Metrology, Graduiertenschule B-IGSM, 12.11.2015
- „Probing an inter-dye-distance of 6 nm on the same object by super-resolution microscopy DNA-PAINT and single-molecule FRET” **Poster**, International Summer School on Metrology, 24.08. - 28.08.2015, Kloster Drübeck, Ilsenburg
- „Probing the same inter-dye-distance of 6 nm by using super-resolution microscopy DNA-PAINT and FRET technique on DNA-Origami” **Poster**, Single Molecule Spectroscopy and Super-resolution Microscopy in the Life Sciences, 02.09 - 04.09.2015, Berlin
- „Probing the same inter-dye-distance of 6 nm by super-resolution DNA-PAINT and FRET on DNA-Origami” **Poster**, Förster Resonance Energy Transfer in life sciences II, 03.04. -06.04.2016, Göttingen

- „Current state of the experimental research” **Vortrag**, Statusseminar GrK 1952/1 | Metrology for Complex Nanosystems NanoMet, 30.03-01.04.2016, Haus Sonnenberg, Sankt Andreasberg
- „Studying the influencing effects on length measurement with DNA Origami” **Poster**, Summer School on Nanometrology, 10.08. – 12.08.2016, Kloster Drübeck, Ilsenburg
- „Probing the same inter-dye-distance of sub 10 nm by using the super- resolution DNA-PAINT and FRET technique on DNA Origami” **Poster**, International Summer School on Metrology 2017 - Frontiers of the Measurable, 08.08. – 11.08.2017, Kloster Drübeck, Ilsenburg
- „Closing the gap: Measuring Identical Distances by Super-Resolution-Microscopy and Single-Molecule FRET” **Poster**, DFG Begutachtung, 02.07. – 03.07.2018, TU Braunschweig, Braunschweig

“Oh yes, the past can hurt.

But the way I see it,
you can either run from it
or learn from it“

Disney’s The Lion King, 1994

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen der Dissertation	III
Abkürzungsverzeichnis	IX
Kurzfassung	XI
Abstract	XIII
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	7
2.1 Biologische Proben	7
2.1.1 Struktur der DNA	7
2.1.2 Design von Nanostrukturen basierend auf DNA	9
2.1.3 HFQ-Protein	11
2.2 Grundlagen photophysikalischer Prozesse	14
2.2.1 Fluoreszenz	14
2.2.2 Superauflösungsfluoreszenzmikroskopie	18
2.2.3 Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)	24
3 Material und Methoden	29
3.1 Herstellung von DNA-Origamis	29
3.1.1 <i>caDNA</i> no	29
3.1.2 Verwendete DNA-Nanostruktur	30
3.1.3 Herstellung eines modifizierten HFQ-Proteins	36
3.1.4 Hybridisierung eines DNA-Origamis	37
3.1.5 Aufreinigungsmethoden für DNA-Origami Nanostrukturen	37
3.1.6 Probenvorbereitung für DNA-PAINT	40
3.2 Experimenteller Aufbau	47
3.2.1 Weitfeld-Mikroskop	47
3.2.2 konfokales Mikroskop	56
3.2.3 Bestimmung des Überlappintegrals und des Förster-Radius	60
3.2.4 Rasterkraftmikroskopie	62
4 Ergebnisse und Diskussion	65
4.1 Überprüfung der korrekten Faltung von DNA-Origami Nanostrukturen für die Superauflösungsmikroskopie	65
4.2 Ergebnisse der Superauflösungsmikroskopie	66
4.2.1 Ergebnisse der DNA-PAINT-Messung von Abständen im Bereich von 6 nm	67

4.3	Ergebnisse der FRET-Experimente	72
4.3.1	Ergebnisse der FRET-Messung von designten Abständen im Bereich von 6 nm am Weitfeld-Setup	72
4.3.2	Ergebnisse der FRET-Messung von designten Abständen im Bereich von 6 nm am konfokalen Setup auf der Oberfläche	81
4.3.3	Ergebnisse der FRET-Messung in Lösung	83
4.3.4	Vermessung der DNA-Origami Nanostruktur mit internen Farbstoffen in Lösung	88
4.4	Zusammenfassung der DNA-PAINT und FRET-Ergebnisse	95
4.5	Überprüfung der Proteinhybridisierung an eine DNA-Origami Nanostruktur	97
4.5.1	Hybridisierung des Proteins über sechs capture-DNA-Stränge	97
4.5.2	Hybridisierung des Proteins über einen capture-DNA-Strang und fünf Haltestränge	98
4.6	Untersuchung der Kopplungseffizienz	102
4.7	Superauflösungsmikroskopie eines auf ein DNA-Origami gespanntes Protein	103
5	Zusammenfassung und Ausblick	111
A	Anhang	117
A.1	<i>caDNA</i> no	117
A.2	Sequenzen der NRO-Stränge	118
A.3	Genutzte Chemikalien	128
A.4	Komponenten zu Hybridisierung, Herstellung, Aufreinigung und Vermessung eines DNA-Origamis	130
A.5	PNAS Permission	130
A.6	Geradengleichung zur Bestimmung der Korrekturfaktoren	131
A.7	Reproduktion der Lösungsmessung	132
A.8	cadnano der GATTAQUANT GmbH Referenz für 5,1 nm	132
	Abbildungsverzeichnis	133
	Tabellenverzeichnis	137
	Literaturverzeichnis	139
	Danksagung	157

Abkürzungsverzeichnis

AA Ascorbinsäure bzw. **Acid**

AFM Atomic **F**orce **M**icroscope

AG Arbeits**G**ruppe

ALEX Alternating **L**aser **E**Xcitation

AOTF Acousto-**O**ptical **T**unable **F**ilter

BSA Bovine Serum **A**lbumin

DBCO Di**B**enzyl**C**yclo**O**ktin

DNA Desoxyribo**N**ucleic**A**cid

DNS Desoxyribo**N**uklein**S**äure

EMCCD Electron **M**ultiplying **C**harge-**C**oupled **D**evice

FRET Förster **R**esonanz **E**nergie **T**ransfer

FWHM Full **W**idth **H**alf **M**aximum

GFP Green **F**luorescent **P**rotein

HF Flusssäure

MM Master**M**ix

MV Methy**V**iologen

NA Numerische **A**pertur

NRO New **R**ectangular **O**rigami

PAINT Points **A**ccumulation for **I**maging in **N**anoscale **T**opography

PBS Phosphatgepufferte Saline

PEG PolyEthylenGlykol

PSF Point Spread Function

RNA RiboNucleic Acid

ROXS Reducing and Oxidizing System

TIRF Total Internal Reflection Fluorescence

TRIS TRIS(hydroxymethyl)aminomethan

Kurzfassung

In der Fluoreszenzmikroskopie können Abstandsmessungen und strukturelle Untersuchungen im Bereich zwischen 1 nm und 10 nm mittels strahlungsloser Energieübertragung zwischen einem Donor- und einem Akzeptormolekül durchgeführt werden. Diese Methode (Förster Resonanz Energie Transfer, kurz FRET) ermöglicht die Betrachtung dynamischer Vorgänge und struktureller Eigenschaften von biomolekularen Komplexen. Die Bestimmung von absoluten Abständen wird durch diverse Einflussfaktoren auf die FRET-Effizienz begrenzt. Die Superauflösungsmikroskopie erlaubt aber die Vermessung der absoluten Distanz zwischen zwei Punktlichtquellen. Durch die fortschreitende Weiterentwicklung der DNA-PAINT-Methode, die auf dem transienten Binden von Fluoreszenzfarbstoffen sowie deren präziser Lokalisation beruht, ist die exakte Darstellung von Abständen im Bereich von 1 nm - 10 nm möglich und kann erstmals in Korrelation mit FRET-Ergebnissen gebracht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt der Vergleich beider Messmethoden am gleichen biologischen Objekt, um abstandsbestimmende Experimente durchzuführen. Als Referenz dienen selbstassemblierende DNA-Origami Nanostrukturen, auf denen Fluoreszenzfarbstoffe präzise positioniert werden. Drei Abstände wurden jeweils mit DNA-PAINT und FRET vermessen. Zur Etablierung beider Methoden an einem für die Superauflösungsmikroskopie ausgelegten Messaufbau erfolgten die Untersuchungen auf jeweils entsprechend konzipierten DNA-Origami Nanostrukturen. Die qualitative Durchführung von FRET und DNA-PAINT am gleichen Messaufbau ist in dieser Arbeit gezeigt und kann für zukünftige Anwendungen optimiert werden. Eine quantitative Analyse der FRET-Ergebnisse wurde an einem etablierten konfokalen Mikroskop realisiert, wodurch die Rückführbarkeit auf die Superauflösung bestätigt werden konnte.

Durch das erreichte Auflösungsvermögen der DNA-PAINT Methode (<10 nm) wird ihre Anwendbarkeit zur strukturellen Analyse eines einzelnen Proteins in dieser Arbeit überprüft. DNA-Origami Nanostrukturen wurden eingesetzt, um das Protein gerichtet und planar auf diesen zu immobilisieren. So können definierte Bereiche gezielt durch die Superauflösungsmikroskopie abgebildet werden. Das hier untersuchte archaeelle HFQ-ähnliche Protein, das wichtige Aufgaben bei der Genregulation übernimmt, ist mit den Nanostrukturen verbunden und mittels DNA-PAINT vermessen worden. Dabei konnte dessen native Struktur sowie Abstände zwischen definierten Bereichen wiedergegeben werden.

Abstract

Distance measurements in the biomolecular range are often carried out using Förster Resonance Energy Transfer (FRET). This method allows the observation of dynamics and structural characteristics of biomolecular complexes within 1 nm to 10 nm. However, the determination of absolute distances is limited by certain factors influencing the FRET efficiency. Super-resolution microscopy on the other hand has the capability to precisely determine the absolute distance between two point-like light sources. Due to the rapid development of the super-resolution microscopy technique DNA-PAINT, based on stochastic binding and unbinding of fluorescent dyes to a target and its continuous localization with high accuracy, distances within 1 nm to 10 nm can be resolved and therefore be correlated with FRET results.

Both techniques were combined within the scope of this work in a way that comparative experiments for distance determination are carried out. Self-assembled DNA origami nanostructures carrying fluorophores precisely positioned serve as reference samples. To establish both methods on a setup originally designed for super-resolution microscopy three distances in the nanometer range were created on different DNA origami nanostructures suitable for DNA-PAINT and FRET measurements, respectively. In principle it is possible to perform qualitative FRET measurements and superresolution fluorescence microscopy on the same setup which offers the possibility in the future to optimize the examinations. A quantitative analysis of FRET values has been carried out by using an established confocal microscope. The retraceability and trustworthiness between both methods to that extent has been validated.

Due to the advanced resolution of under 10 nm by DNA-PAINT, its implementation on the structural analysis of a single protein should be investigated in this work, too. DNA origami nanostructures serve as breadboard to immobilize a protein in a planar way. That leads to depicting defined regions of the biomolecule structure by super resolution microscopy. That way, a HFQ-like protein, which has an important role in gene regulatory processes was immobilised via single stranded DNA on the nanostructures and measured by DNA-PAINT. The native structure of the protein as well as distances at distinctive positions were reproduced.

1 Einleitung

“Kleine Dinge geben oft
Antwort auf große Fragen“
F.I. Romay (Autor)

Die kleinsten Einheiten des menschlichen Körpers, die Zellen und ihre Bestandteile, bestimmen unser Aussehen, Stoffwechselvorgänge oder die Stärke des Immunsystems. Den Aufbau sowie die Interaktionen einzelner Zellbestandteile zu untersuchen, ermöglicht es, die Vorgänge im menschlichen Organismus zu verstehen. Die Analyse und Abbildung solch makro- und mikroskopischer Einheiten stellt die Wissenschaft bis heute vor diverse Herausforderungen und fordert die stetige Entwicklung und Verfeinerung der bestehenden Methoden. Nur wenn die kleinsten Bestandteile, die uns beeinflussen, genau untersucht werden können, ist es möglich, Erklärungen für deren komplexes Zusammenspiel sowie die dadurch bedingten Auswirkungen auf den Organismus zu geben.

Seit dem späten 17. Jahrhundert war es möglich, Bakterien, Hefen oder die Zirkulation von Blutkörperchen in den Kapillaren zu beobachten. Das von van Leeuwenhoek dazu entwickelte Lichtmikroskop war eine revolutionäre Erfindung und erlaubte die Betrachtung von Objekten der Größe eines Mikrometers. Die Strukturen, die den Organismus in größtem Maß beeinflussen und deren Untersuchung somit das meiste Interesse gilt, liegen allerdings in einer Größenordnung von unter einem Mikrometer. Diese Auflösung konnte erst in den 1850er Jahren erreicht werden. Zu dieser Zeit begannen Carl Zeiss und Otto Schott die verwendeten Linsen zu verbessern und die optische Qualität der Zeiss-Mikroskope zu steigern [1]. Trotz der eindrucksvollen Weiterentwicklung der Mikroskope liegt das theoretische Auflösungsvermögen in Abhängigkeit der Wellenlänge bei 200 Nanometern. Dieses sogenannte *Beugungs-* oder *Abbe-Limit* wurde im 19. Jahrhundert von Ernst Abbe postuliert und besagt, dass zwei Strukturen über diesen Mindestabstand zueinander verfügen müssen, um sie als getrennte Objekte wahrnehmen zu können [2]. Der Größenbereich von Zellorganellen (Zellkern, Mitochondrien oder Ribosomen), Viren, Makromolekülen (Proteine, Nukleinsäuren oder Polysaccharide) und organischen Molekülen erstreckt sich aber von 1 nm bis 1 μ m. Mit einem herkömmlichen Lichtmikroskop lassen sich die für die Abläufe im Organismus essentiellen kleinen (<200 nm) Bestandteile nicht untersuchen. Andere Methoden zur Auflösung solcher Strukturen wie das Elektronenmikroskop existierten

zu dieser Zeit bereits, allerdings waren sie aufgrund extremer Messbedingungen (hohe Strahlendosen, Messung im Vakuum) nicht geeignet, um lebendige Systeme zu betrachten [3] [4]. Ein neues methodisches Konzept, welches als *superauflösende Fluoreszenzmikroskopie* bezeichnet wird, erlaubt jedoch die Auflösung unterhalb des Beugungslimits [5] [6] [7] [8] [9] [10] [11]. Diese Technik nutzt dazu das Phänomen der Fluoreszenz, bei der Moleküle durch die Einstrahlung von Licht bestimmter Wellenlänge zur spontanen Emission von längerwelligem Licht angeregt werden. Anregungs- und Emissionslicht sind dadurch voneinander getrennt zu betrachten und helfen, Moleküle und Organellen kontrastreich und spezifisch abzubilden [4]. Für die Abbildung einer Struktur wird diese chemisch mit fluoreszierenden Molekülen (Fluoreszenzfarbstoffen) markiert oder gentechnisch mit einem fluoreszierenden Protein fusioniert [12] [13]. Um das Beugungslimit zu umgehen, genügt es nicht, die Probe mittels Fluoreszenz zu untersuchen. Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie, in ihrer Auflösung unterliegt auch sie dem Beugungslimit nach Abbe. Sie verfügt allerdings über diverse Möglichkeiten das Beugungslimit mit ausgeklügelten physikalischen und chemischen Vorgehensweisen zu überwinden [14]. Besonders weit verbreitet sind Verfahren, bei denen die Emission der Fluoreszenzfarbstoffe gezielt unterdrückt werden kann [5]. Durch das gezielte An- und Ausschalten eines fluoreszierenden Moleküls lassen sich auch im Größenbereich kleiner als 200 nm unterschiedliche Strukturen erkennen [15]. Vorreiter auf diesem Gebiet war die deterministische STED-Mikroskopie (*Stimulated Emission Depletion*) [6] [16] [17]. Durch einen Anregungslaserstrahl werden zunächst einige Moleküle angeregt. Ein zweiter längerwelliger Laserstrahl überführt die Fluoreszenzfarbstoffe in den Grundzustand (stimulierte Emission). Dabei wird das Intensitätsprofil des zweiten Lasers so gestaltet, dass die Emission des Fluoreszenzlichts auf einen zentralen Punkt verkleinert wird [6] [18]. Dadurch wird eine deutlich höhere Auflösung im Vergleich zu herkömmlichen Lichtmikroskopen erreicht. Im Jahr 2014 ist diese von Stefan Hell entwickelte Technik, bei der während der Messung ein supraaufgelöstes Bild erhalten wird, mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet worden [19] [20].

Neben Stefan Hell wurden Eric Betzig und William E. Moerner für ihre unabhängig voneinander entwickelten Ansätze zur Umgehung des Beugungslimits ausgezeichnet [7] [8] [9]. Bei diesem als *Lokalisationsmikroskopie* bezeichneten Ansatz werden photoaktivierbare fluoreszierende Proteine oder Fluoreszenzfarbstoffe durch chemische Puffer stochastisch in An- und Aus-Zustände überführt [8] [21] [22]. Der Großteil der fluoreszierenden Moleküle befindet sich dabei stets in einem langlebigen Aus-Zustand, nur wenige werden zeitlich sequentiell angeregt. Gelangen die Moleküle in den fluoreszierenden Zustand, werden ihre Emissionsmuster mit Hilfe eines mathematischen Algorithmus beschrieben und deren Mittelpunkte erfasst und vermerkt. Diese Mittelpunkte entsprechen der genauen Position eines jeden einzelnen Fluoreszenzfarbstoffs [15]. Dadurch ist die Bestimmung von absoluten Abständen zwischen zwei Punktlichtquellen möglich. Der Schaltprozess wird viele Male wiederholt.

Aus der Summe aller lokalisierten Positionen wird ein finales superaufgelöstes Bild rekonstruiert [15] [20]. Abbildung 1.1 zeigt beispielhaft die beugungsbegrenzte und die mittels dSTORM rekonstruierte superaufgelöste Darstellung einer menschlichen T-Lymphozyte.

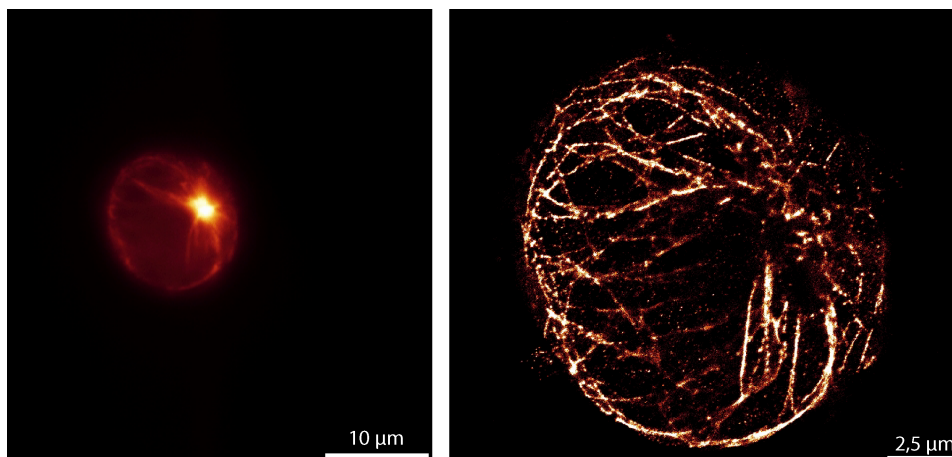


Abbildung 1.1: Darstellung des Tubulinskeletts einer menschlichen T-Lymphozyte durch indirekte Immunfluoreszenz. Links ist das beugungsbegrenzte Abbild der Zelle gezeigt. Rechts ist die durch zeitlich sequentielle Anregung rekonstruierte superaufgelöste dSTORM Aufnahme zu sehen.

Die Lokalisationsmikroskopie zeichnet sich durch eine Vielzahl unterschiedlicher Verfahren wie PALM (englisch *Photoactivated Localization Microscopy*) [8], STORM [21] und dSTORM (englisch *[direct]Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) [23][24] zur zeitlich sequentiellen Fluoreszenzemission aus. Weitere Techniken nutzen ein chemisch induziertes intrinsisches Blinken (Blink Mikroskopie) [25] [26] oder ein Pseudoblinken, welches durch Bindungskinetiken beeinflusst werden kann [10] [27]. Letztere sogenannte *Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography (PAINT)*-Methode ist in einer erweiterten Form Hauptbestandteil dieser Arbeit [27] und nutzt die spezifische Affinität von Fluoreszenzfarbstoffen zu einem bestimmten Material. Die in Lösung befindlichen Farbstoffe interagieren für kurze Zeit (transient) mit dem auf einer Oberfläche befestigtem Material, wobei sie in den Anregungsstrahl des Lasers gelangen. Kurz darauf lösen sich die Fluoreszenzfarbstoffe und können zu einer anderen Stelle des Materials diffundieren. Auf diese Art und Weise werden lediglich die Farbstoffe detektiert, die mit dem Material auf der Oberfläche in Kontakt sind. Optisch entsteht ein Blinken der Moleküle.

Mit Hilfe der Vielzahl an Methoden zur superaufgelösten Darstellung der kleinsten Strukturen des Organismus lassen sich diese mit einer räumlichen Auflösung bis 20 nm erfolgreich wiedergeben [28] [29]. Der biomolekular relevante Bereich von 1 – 10 nm, in dem molekulare Interaktionen statt finden [30], konnte aufgrund dieser Begrenzung bis 2014 nicht durch Superauflösungsmikroskopiemethoden abgebildet werden [11] [29] [31]. Üblicherweise werden Messungen in diesem Bereich mittels Kristallographie [32], Kernmagnetischer

Resonanz [32] [33], Elektronenspinresonanz [34] oder **F**örster **R**esonanz **E**nergie **T**ransfer (FRET) Experimenten durchgeführt [35]. Bei FRET handelt es sich um eine strahlungslose Energieübertragung von einem Farbstoffmolekül (Donor) auf ein zweites Farbstoffmolekül (Akzeptor). Je weiter die beiden Moleküle voneinander entfernt sind, desto geringer ist die Übertragungseffizienz der Energie [36]. Mittels dieser Methode lassen sich sowohl strukturelle Eigenschaften als auch die Dynamik biomolekularer Komplexe untersuchen [37] [38]. Ebenso wird FRET für die Abstandsbestimmung innerhalb der Biomoleküle eingesetzt. Die Problematik in der Abstandsbestimmung mittels FRET besteht in der fehlenden Rückführbarkeit der übertragenen Energie auf den Abstand zwischen den Molekülen [39]. Beispielsweise kann die Orientierung der Übergangsdipolmomente κ^2 variieren, was die Übertragungseffizienz beeinflusst [40]. Bis 2014 existierte eine Lücke im Bereich von 10 nm - 20 nm, die sich weder durch herkömmliche Methoden der Fluoreszenzmikroskopie noch FRET darstellen ließ. Ende 2016 gelang dem Forscherteam um Stefan Hell mit einem neu entwickelten sogenannten *MINFLUX* Mikroskop die optisch getrennte Darstellung einzelner Fluoreszenzfarbstoffe, die nur sechs Nanometer voneinander entfernt waren [41]. Auch die erweiterte Form der PAINT-Methode, das sogenannte **D**esoxyribo**N**ucleic**A**cid (DNA)-PAINT [10] [11] [29] [42], erreicht Auflösungen im Bereich unter 10 nm. Innerhalb dieser Größenordnung sind bisher zelluläre Strukturen wie Mikrotubuli oder Aktinfilamente zum Vergleich der einzelnen Messmethoden verwendet worden. Nachteilig ist hierbei die fehlende Reproduzierbarkeit, denn in jeder Messung wird aufgrund der Individualität jeder Zellstruktur ein neues Muster betrachtet [43]. Es galt insofern identische Strukturen im Nanomaßstab als Referenz zu erschließen, die sich leicht vervielfältigen und reproduzieren lassen. Dies gelang elegant mit Hilfe der DNA-Origami Technik [44]. Dabei wird ein langer zirkulärer DNA-Einzelstrang mit Hilfe einer Vielzahl von kurzen komplementären DNA-Einzelsträngen in Selbstassemblierung in eine zuvor definierte Struktur gebracht [45] [46] [47]. DNA-Origami Nanostrukturen können beliebig modifiziert werden, beispielsweise durch einzelsträngige Verlängerungen [11], Fluoreszenzfarbstoffe [48], diverse Moleküle wie Vitamine [49] oder Nanopartikel [50]. Sie können genutzt werden, um die bereits erwähnte DNA-PAINT Methode anzuwenden [10]. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind dabei an DNA-Einzelstränge gekoppelt, die wiederum kurzzeitig an aus der Nanostruktur ragende komplementäre Stränge binden [10]. So ist eine ortsspezifische Lokalisation der Farbstoffe in definiertem Nanometerabstand mit hoher Präzision gewährleistet [51].

Die erstmalige Rückführbarkeit des Energieübertrags durch FRET auf einen präzise lokalisierten Abstand im Bereich kleiner 10 nm ist zentrales Thema dieser Arbeit. Dazu wird die Energieübertragungseffizienz eines auf einer DNA-Origami Nanostrukturen definierten Abstands mittels FRET vermessen. Zur Validierung wird der identische Abstand zusätzlich durch DNA-PAINT aufgelöst. Angestrebt wird die Wiedergabe eines definierten

Abstands durch DNA-PAINT und FRET. Beide Methoden werden an einem Messaufbau durchgeführt, der bisher nur für die Superauflösungsmikroskopie eingesetzt wurde. In dieser Arbeit werden für jede Messmethode angepasste DNA-Origami Nanostrukturen verwendet, um den genutzten Messaufbau zuverlässig für beide Methoden zu etablieren. Dabei soll zusätzlich ein neuer roter Farbstoff eingesetzt und etabliert werden. Durch dessen Einsatz in beiden Messmethoden soll die direkte Rückführbarkeit und Zuverlässigkeit der erhaltenen Ergebnisse bekräftigt werden. Darauf aufbauend kann die Umsetzung zur Durchführung von sequentiellen Messungen der selben Nanostruktur angestrebt werden. Die Prüfung der erhaltenen Ergebnisse erfolgte an einem für die FRET-Experimente ausgelegten konfokalen Messaufbau. Zur quantitativen Bestimmung der Energieübertragungseffizienz wurden zusätzlich ergänzende Untersuchungen mit einem etablierten, fest in der DNA-Origami Nanostruktur integrierten Farbstoffpaar (FRET-Paar) an diesem Aufbau durchgeführt.

Die Superauflösungsmikroskopie mit transientem Binden ist eine Technik mit beispielloser Auflösung, Beständigkeit gegenüber Photobleichen und hoher Markierungsdichte, wodurch sie eine vielversprechende Anwendung für die Betrachtung von biologischen Systemen mit höchster Präzision darstellt [10] [11] [29] [51] [52]. Dieser Vorzug soll in der vorliegenden Arbeit ebenfalls vertieft werden. Durch die rasante Senkung der Auflösungsgrenze durch DNA-PAINT in einen Bereich kleiner 20 nm kann die strukturelle Analyse eines im Durchmesser 6 nm großen Proteins realisiert werden. Um das hier untersuchte Protein der Superauflösungsmikroskopie zugänglich zu machen, ist die zufällige Orientierung des Proteins, die die exakte Vermessung einzelner Abstände limitiert, zu verhindern. In dieser Arbeit wird durch die Verwendung der DNA-Origami Nanostrukturen eine Plattform geschaffen, auf die das Protein gerichtet und planar gebunden wird. Dazu wird das HFQ-ähnliche Protein zunächst ortsspezifisch mit einzelsträngiger DNA modifiziert. Über einzelsträngige DNA, die aus der Nanostruktur herausragen, wird das Protein mit dieser verbunden und seine Struktur mittels DNA-PAINT abgebildet. Das angestrebte Ziel ist die Darstellung einzelner Proteinstrukturen in einem hochaufgelösten Bild, um biologische Proben dem weiten Anwendungsfeld der Superauflösungsmikroskopie zugänglich zu machen.

2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel wird auf die theoretischen Grundlagen eingegangen, welche für das Verständnis dieser Arbeit nötig sind. Dazu wird zuerst die Chemie und Biologie der verwendeten Proben erläutert. Um die Untersuchungsmethoden der Proben zu verstehen, werden im Folgenden die photophysikalischen Prinzipien sowie deren gezielte Anwendung für das Feld der Superauflösungsmikroskopie beschrieben. Besonders fokussiert wird dabei das Themenfeld der lokalisationsbasierten Mikroskopie. Abschließend werden die theoretischen Aspekte des strahlungslosen Energieübertrags FRET erläutert.

2.1 Biologische Proben

2.1.1 Struktur der DNA

Die **DesoxyriboNukleinSäure** (DNS) bzw. **DesoxyriboNucleicAcid** (DNA) ist der Speicher der Erbinformationen. Die DNA kann aufgrund voranschreitender Forschung nicht mehr nur als Speichermedium gesehen werden, sondern ist seit den frühen 1980ern vor dem Hintergrund ihrer Beschaffenheit neuen Wissenschaftsfeldern wie der Nanobiotechnologie zugänglich [45] [53]. Im folgenden Kapitel wird zunächst der strukturelle Aufbau der DNA beschrieben, welcher den Grundstein für die Entwicklung von selbstassemblierenden Nanostrukturen, den sogenannten DNA-Origami Nanostrukturen, bildet.

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurden die Einzelbestandteile der DNA entdeckt: die vier Nukleinbasen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T), Ribose und Phosphatreste [54]. Die dreidimensionale Struktur wurde 1953 durch Watson und Crick beschrieben [55]. Sie stellten fest, dass die DNA aus zwei schraubenförmig umeinander gedrehten Strängen (Doppelstrang) besteht. Das Rückgrat dieser Helix bildet sich jeweils aus Zuckermolekülen, der Desoxyribose, die im Wechsel über Phosphatreste verbunden sind. Dabei liegen sich ein freier Phosphatrest am 5'-Ende und eine freie Hydroxylgruppe am 3'-Ende gegenüber [56]. Die bereits genannten Nukleinbasen befinden sich im Inneren der Helix. Eine schematische Darstellung der DNA ist in Abbildung 2.1 gezeigt.

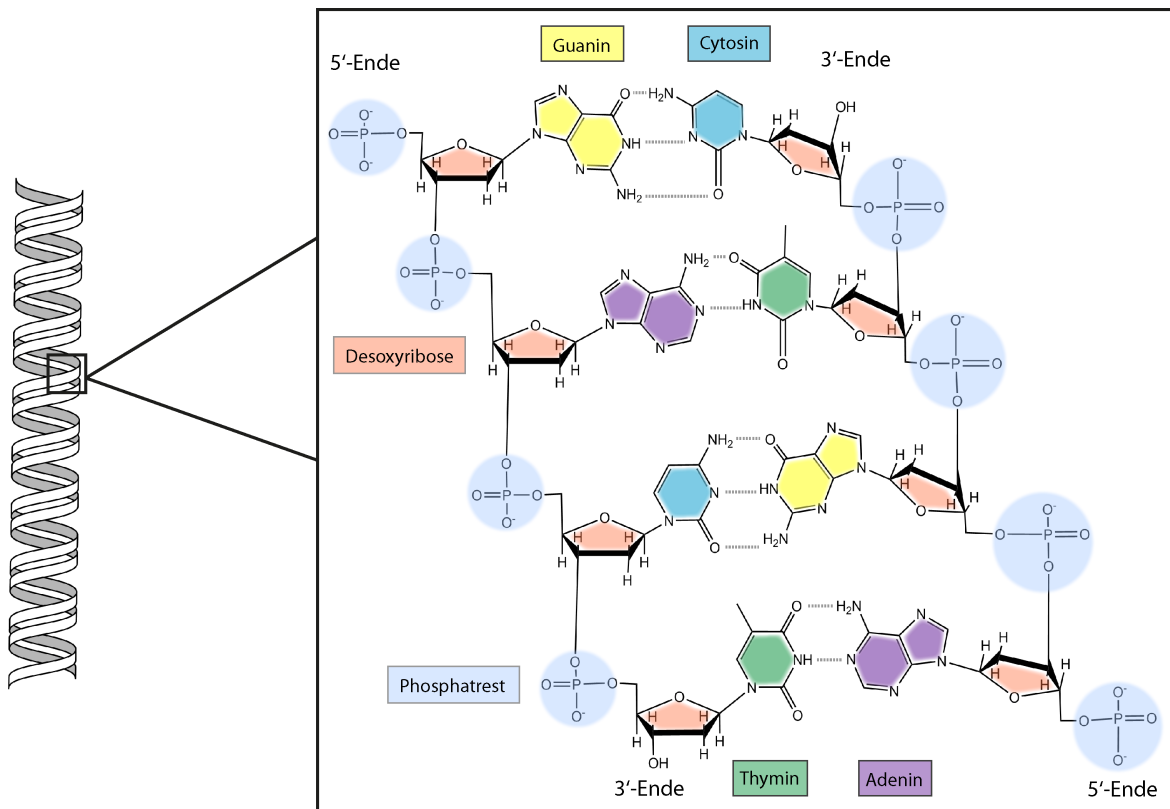


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der DNA-Doppelhelix und ihr Aufbau nach [57]. Zuckermoleküle und Phosphatreste bilden das Rückgrat der DNA. Die Zuckermoleküle sind mit den Nukleinbasen Thymin (grün), Adenin (violett), Cytosin (blau) und Guanin (gelb) verbunden. Zwei der Basen interagieren jeweils über spezifische Wasserstoffbrückenbindungen miteinander und verknüpfen so die einzelnen DNA-Stränge.

Die Gleichmäßigkeit in der Struktur der sogenannten und in dieser Arbeit verwendeten B-DNA wird bedingt durch die stete Kombination eines Purins mit einem Pyrimidin, sodass der Abstand zwischen den Strängen überall identisch ist [57]. Adenin und Guanin zählen zur Familie der Stickstoffbasen mit 2 organischen Ringen, den Purinen. Die Pyrimidine Cytosin und Thymin gehören zu den Stickstoffbasen mit nur einem Ring, siehe Abbildung 2.1. Über Wasserstoffbrückenbindungen binden die Nukleotide komplementär untereinander, wobei Adenin mit Thymin über zwei und Cytosin mit Guanin über drei Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind [57]. Die Wasserstoffbrückenbindungen reichen für das stabile Vorkommen der DNA in Lösung nicht aus. Die maßgeblich stabilisierende Kraft beruht auf Dipoleffekten zwischen teilweise positiv geladenen Gruppen der Basen mit den Elektronenwolken der vertikal benachbarten Basen [58] [59]. Diese Basenstapelkraft führt zu gleich langen Abständen, sodass die gesamte Struktur über einen Durchmesser von ungefähr 2 nm verfügt. Die Helix windet sich mit jeder Desoxyribose um 36° weiter [55] [60]. Eine vollständige Windung wird nach zehn Basenpaaren erreicht, wodurch sich die Länge

einer Windung von 3,4 nm ergibt [57]. Durch das Winden beider Einzelstränge umeinander entstehen geometrisch bedingt sogenannte *Furchen* an der Oberfläche der DNA-Struktur. Diese sind unterteilt in eine *große* und eine *kleine Furche*. Die *große Furche* ist etwa 2,2 nm, die *kleine Furche* 1,2 nm breit [61] [62].

Nachdem die Struktur der DNA publik geworden war, ergaben sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. Die genaue Sequenzabfolge der DNA-Stränge kann analysiert werden, was für medizinische, therapeutische oder kriminaltechnische Anwendungen genutzt wird [63] [64]. Die hohe Spezifität der Basenpaarung eröffnete der Wissenschaft einen weiteren Anwendungsbereich: die *strukturelle DNA-Nanotechnologie* [47] [65]. Dieser Forschungsansatz verfolgt das Ziel durch gezielte Manipulation von DNA synthetisch stabile Nanostrukturen durch spontane Assoziation (Selbstassemblierung) der Moleküle herzustellen [66]. Diese Nanostrukturen können als Grundlage künftiger Biosensoren [67] [68], künstlicher Ionenkanäle [69] oder Anwendungen im interdisziplinären Rahmen [70] [71] dienen.

2.1.2 Design von Nanostrukturen basierend auf DNA

Aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften sollten DNA-Moleküle im Laufe der Jahre als molekulare Bausteine für selbstassemblierende Nanostrukturen zum Einsatz kommen. Ideengeber Nadrian Seeman gilt seither als Gründervater der DNA-basierten Nanotechnologie [72] [73]. Die ersten DNA Nanostrukturen wurden durch die Verbindung von kurzen sogenannten DNA-Junctions aus drei bis acht Doppelhelices miteinander hergestellt [74]. Im Jahr 2006 zeigte Paul Rothemund eindrucksvoll, welche Formen und Strukturen mit Hilfe von DNA Molekülen, sogenannte *DNA-Origami Nanostrukturen* (im Allgemeinen DNA-Origamis), geformt werden können [45]. Die revolutionäre Neuerung dieser Methode war die Synthese der Strukturen aus einem langen zirkulären, einzelsträngigen DNA-Gerüst (*Scaffold*) mit Hilfe diverser 30 bis 40 Nukleotide langer DNA-Oligonukleotidstränge. Dem aus einem viralem Genom (M13mp18¹, 7249 bp) gewonnenen *Scaffold* wird eine Vielzahl kurzer DNA-Einzelstränge (*staple strands*) zugegeben, die lediglich zu einer speziellen Basenfolge im *Scaffold* komplementär sind. Sie werden so angeordnet, dass interhelikale Kreuzungen entstehen, wodurch zwei oder mehrere Helices des *Scaffolds* miteinander verbunden werden. Durch diese internen Kreuzungen entstehen selbst assemblierend die gewünschten Strukturen [47] [76]. Die zusammengefügte Komponenten werden anschließend erwärmt, sodass sich bei Raumtemperatur entstandene Sekundärstrukturen des *Scaffolds* wieder lösen. Durch die darauffolgende schrittweise Abkühlung binden die *staple strands* entsprechend ihrer Sequenz an die gewünschten Stellen im *Scaffold* und zwingen diesen in die gewünschte Form. Die schematische Darstellung dieses Prozesses ist in Abbildung 2.2 gezeigt.

¹M13mp18 ist ein M13 *lac* Phagenvektor, der in *E.coli* vermehrt wird [75]

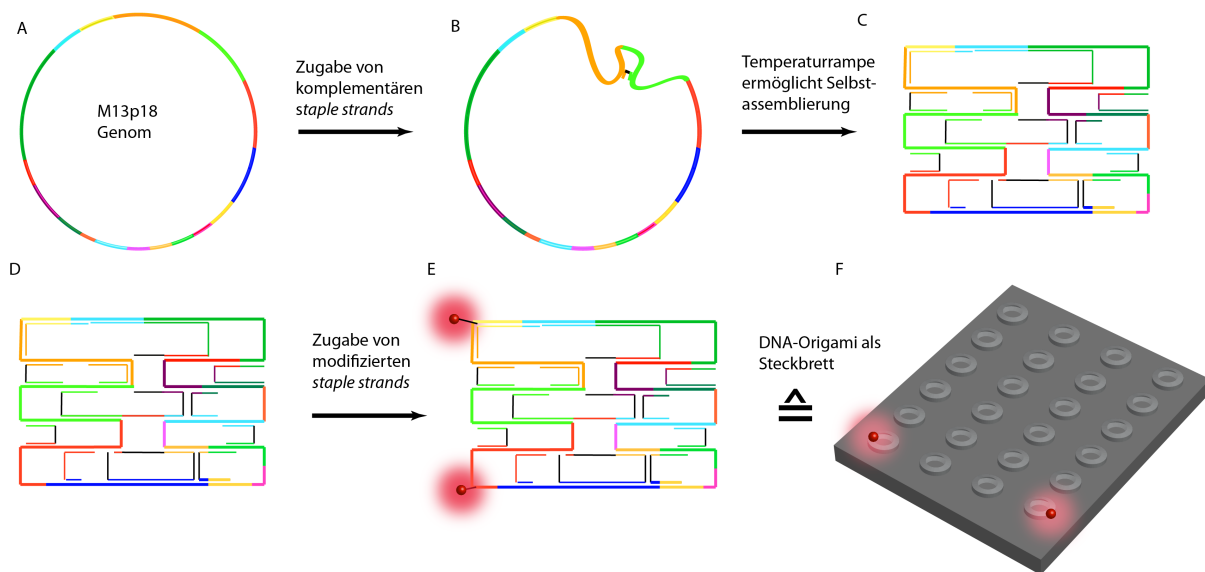


Abbildung 2.2: Prinzip der Herstellung einer DNA-Origami Nanostruktur. A-C: Einem zirkulären DNA-Einzelstrang (*Scaffold*) werden kurze komplementäre DNA-Stränge, sogenannte *staple strands*, zu gegeben. Diese hybridisieren an die komplementären Nukleotidsequenzen im *Scaffold*. D-F: Das erhaltene DNA-Origami kann durch Zugabe verschiedener Moleküle modifiziert und für diverse Anwendungen wie die Fluoreszenzmikroskopie genutzt werden. Das exakte Positionieren der Moleküle macht das DNA-Origami zu einem Steckbrett im Nanometermaßstab.

Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist die parallele Selbstassemblierung, wodurch eine wesentliche Zeitersparnis gegenüber der von Seemann vorgestellten Methode erreicht wird [43]. Weiterhin zeichnet sich die DNA-Origami Technik durch eine hohe Ausbeute und Reproduzierbarkeit identischer und robuster Strukturen aus [71].

Die entsprechende Form des DNA-Origamis wird vorab am Computer mit Hilfe spezieller Programme (beispielsweise *caDNA* [77]) gestaltet. Bedingt durch die gewünschte Form und bekannte Basenfolge des *Scaffolds* geben diese Programme sowohl die Sequenzen der *staple strands* als auch deren Position aus. Besonders letzteres ermöglicht die Nutzung von DNA-Origamis als Steckbrettstruktur, auf der sich verschiedenste Modifikationen wie Farbstoffe [48], Vitamine zur Immobilisierung [78] oder Nanopartikel [50] anbringen lassen. Durch diese gezielte Positionierung können besonders Farbstoffe, wie in Abbildung 2.2 E gezeigt, äußerst genau in oder an den DNA-Origamis angebracht werden. So lassen sich die Nanostrukturen als Lineale im Nanometermaßstab für die Fluoreszenzmikroskopie nutzen [43]. Dadurch sind DNA-Origamis zur Prüfung des räumlichen Auflösungsvermögens eines Mikroskops und zur Bestimmung statistischer Fehler solcher Messungen geeignet [43] [71]. Des Weiteren können DNA-Origami Nanostrukturen als Nanofabriken, zum *drug delivery* oder als Biosensoren eingesetzt werden [68].

2.1.3 HFQ-Protein

Eine weitere biologische Struktur, die in dieser Arbeit betrachtet wird, ist ein *HFQ*-ähnliches Protein aus der Archaeenart *Methanocaldococcus jannaschii* [79]. Es soll überprüft werden, ob die native Struktur des HFQ mittels supraauflösender Fluoreszenzmikroskopie abgebildet werden kann. Das aus *Methanocaldococcus jannaschii* gewonnen HFQ-ähnliche Protein hat, ähnlich wie das 1968 als *Host factor* des Darmbakteriums *Escherichia coli* entdeckte Original-Protein [80] [81] [82] [83], essentielle Aufgaben bei der Kontrolle der Genexpression, wie die Regulation von Transkriptionsfaktoren [84]. Das Protein ist aus sechs identischen Untereinheiten (*Monomeren*) aufgebaut, die als *Hexamer* einen Ring bilden [85]. Die Untereinheiten lassen sich modifizieren und ermöglichen so den Einsatz des Proteins für weitere Forschungsgebiete, durch welche die genaue Biologie des HFQ und dessen Aufgaben besser verstanden werden können [86] [87]. Die schematische Darstellung der Struktur des Proteins ist in folgender Abbildung 2.3 gezeigt.

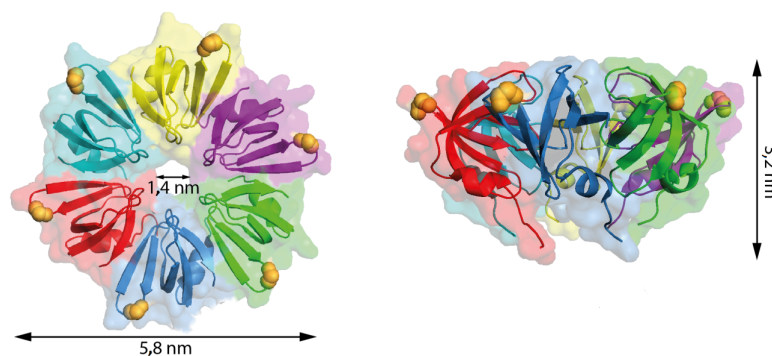


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des HFQ-Proteins. Links ist das aus sechs Monomeren gebildete ringförmige Hexamer gezeigt. Zur leichteren Unterscheidung der identischen Monomere sind diese in unterschiedlichen Farben dargestellt. Das Protein ist ~ 6 nm lang und verfügt über eine etwa 2 nm breite Öffnung im Zentrum. Die gelblichen Sphären symbolisieren die Modifikationen in den einzelnen Monomeren. Diese sind auch rechts illustriert. Das Protein verfügt über eine Höhe von etwa 3 nm. Die Abbildung wurde von der ArbeitsGruppe (AG) Grohmann zur Verfügung gestellt [79].

Das HFQ-Protein besitzt einen Durchmesser von ungefähr 6 nm und ist etwa 3 nm hoch, siehe Abbildung 2.3. In zentraler Position findet sich eine 1,4 nm kleine Öffnung, welche die Bindung von Ribonukleinsäure (**RiboNucleic Acid** (RNA)) ermöglicht [88]. Zur besseren Veranschaulichung sind die sechs Untereinheiten des Proteins in verschiedenen Farben dargestellt. Die bereits erwähnten möglichen Modifikationen sind hier beispielhaft durch die gelblichen Sphären illustriert. Eine mögliche Modifikation, wie sie in dieser Arbeit genutzt wird, ist die Integration einer unnatürlichen Aminosäure. Dafür ist die Originalsequenz des Proteins an Aminosäureposition G55 verändert worden. Diese Position findet sich

am äußeren Rand des Proteins, wodurch die Modifikationen von der Struktur fort zeigen. Durch diese Modifikation der Monomere können mit Hilfe einer *Click-Chemie Reaktion* DNA-Einzelstränge an das Protein gekoppelt werden. Das Protein wird dazu zunächst mit dem DNA-markierten Molekül **DiBenzylCycloOktin** (DBCO) inkubiert, welches eine sogenannte bioorthogonale Markierung (*strain-promoted click reaction*) ermöglicht. Bei DBCO handelt es sich um ein Molekül, welches spezifisch mit Aziden in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition reagiert [89]. Es verfügt über eine C-C-Dreifachbindung und ist zusätzlich mit einzelsträngiger DNA modifiziert. Die Dreifachbindung des DBCO reagiert mit dem N_3 Terminus der unnatürlichen Aminosäure und verbindet das HFQ-Protein so mit der einzelsträngigen DNA. Diese Click-Reaktion ist schematisch in Abbildung 2.4 gezeigt:

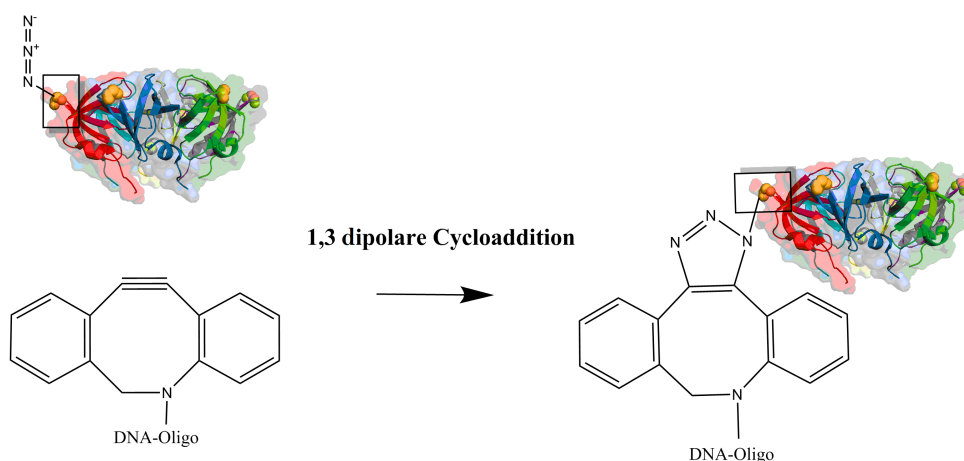


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Click-Reaktion. Die C-C-Dreifachbindung des DBCO reagiert mit dem Azidrest der unnatürlichen Aminosäure. Der Azidrest ist exemplarisch durch eine gelbe Sphäre dargestellt und wird gesondert hervorgehoben, um die Click-Reaktion zu verdeutlichen. Über eine 1,3-dipolare Cycloaddition bildet sich ein Fünfring, der das DBCO kovalent mit dem Protein verbindet. Durch diese Reaktion können DNA-Sequenzen an das HFQ gekoppelt werden.

Click-Reaktionen beziehungsweise Reaktionen, die unter *Click Chemie* verstanden werden, sind definiert als Reaktionen, die eine hohe Ausbeute liefern, einfach durchzuführen und stereospezifisch sind sowie unbedenkliche Nebenprodukte liefern [90]. Diese Form der Koppelung ist eine gute Alternative zu den mit Kupfer durchgeführten Click-Reaktionen. Kupfer ist cytotoxisch und limitiert somit den Einsatz für biologische Anwendungen. Durch DBCO entsteht bei physiologischen Temperaturen und pH Bereichen eine kovalente Bindung [89], wodurch keine Schädigung der Biomoleküle auftritt. Außerdem bauen die Benzolringe am Cyclooctin eine hohe Spannung auf und senken somit die Aktivierungsenergie der Reaktion. Durch diese *Click-Chemie Reaktion* werden DNA-Einzelstränge an das Protein gekoppelt, siehe Abbildung 2.4. Diese sind teilweise komplementär zu aus dem DNA-Origami ragenden

DNA-Strängen. Dadurch kann das Protein an die Nanostruktur gebunden und für die supraauflösende Fluoreszenzmikroskopie zugänglich gemacht werden. Diese Methode besitzt deutliche Vorteile gegenüber anderen bisher genutzten bildgebenden Verfahren, weshalb sie im Rahmen dieser Arbeit zur Darstellung der nativen Proteinstruktur realisiert werden soll. Die dreidimensionale Darstellung biologischer Strukturen am Computer liefert erste Einblicke in deren Aufbau und Funktion. Für diese Darstellungsweise wird das Protein zunächst kristallisiert und die Strukturinformationen anschließend aus einer *Röntgenstrukturanalyse* erhalten. Dabei wird ein Röntgenstrahl auf das Protein gerichtet, dessen Kristalle den Strahl beugen. Aus dem entstandenen Beugungsmuster können Computerprogramme entsprechende Modelle des Proteins erstellen [57]. Die Kristallisation ist nicht auf alle biologischen Moleküle anwendbar [91] und eine langwierige Prozedur [92] [93] [94]. Die schnelle und erfolgreiche Darstellung einer einzelnen in vivo Struktur wird durch die Röntgenstrukturanalyse nicht gewährleistet. Bei der Cryo-Elektronenmikroskopie werden die zu untersuchenden biologischen Proben in einem Schnellgefrierverfahren konserviert, wodurch ihre nativer Zustand nahezu erhalten bleibt [95]. Die Auflösung im Subnanometerbereich konnte bisher nicht realisiert werden. Zur bildlichen Darstellung von Proteinen kann auch die Immunfluoreszenz eingesetzt werden. Dazu wird das Protein von einem Antikörper erkannt, an den ein weiterer, fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper bindet. Auch diese Methode ist im Vergleich zu DNA-PAINT mit besonderem Aufwand verknüpft, da spezifisch Antikörper hergestellt werden müssen, die das Protein erkennen und markieren können [96]. Die bereits erwähnten Techniken der Superauflösungsfluoreszenzmikroskopie wie PALM [8], STORM [21] und dSTORM [23][24] sind durch ihre räumliche Auflösung von 20 nm begrenzt und daher für die Darstellung des HFQ-Proteins nicht einsetzbar. Auch die Expression fluoreszierender Moleküle wie **Green Fluorescent Protein** (GFP) durch das Protein selbst [97] könnte in diesem Bereich nicht aufgelöst werden. Um die native Struktur des HFQ-ähnlichen Proteins darstellen zu können, bietet sich lediglich die Superauflösungsmikroskopiemethode DNA-PAINT an.

2.2 Grundlagen photophysikalischer Prozesse

Um die DNA-Origami Nanostrukturen als auch das darauf gebundene Protein mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe abbilden zu können, muss zunächst das Prinzip der Fluoreszenz verstanden werden. Die selbstassemblierten Strukturen werden mittels einer besonderen Methode der supraauflösenden Fluoreszenzmikroskopie untersucht, welche ebenfalls erläutert wird. Da sich die definierten Abstände auf den Nanostrukturen für diese Arbeit in einem Bereich < 10 nm befinden, werden diese ebenfalls durch eine Methode der strahlungslosen Energieübertragung, dem sogenannten Förster Resonanz Energie Transfer (FRET), untersucht. Durch die Vermessung des identischen designten Abstands auf den Nanostrukturen mittels FRET soll überprüft werden, ob die jeweiligen Ergebnisse in Korrelation zueinander stehen und sich somit gegenseitig validieren.

2.2.1 Fluoreszenz

Fluoreszenz wird als die spontane Lichtemission eines Moleküls verstanden, welches zuvor durch Licht angeregt wurde. Die Emission des Lichts entsteht durch ein Elektron, dass aus einem elektronisch angeregten in einen elektronisch niedrigeren Zustand unter Beibehaltung des Spins übergeht. In einem organischen Molekül werden fluoreszierende Eigenschaften meist durch ausgedehnte aromatische Systeme bedingt. Solche Moleküle werden als Fluorophore bezeichnet. Absorbiert ein Fluorophor die kleinste Einheit des Lichts, ein Photon, gelangt ein Elektronen aus dem Grundzustand auf ein höheres Energieniveau. Die Energie des Photons wird beschrieben durch die Lichtgeschwindigkeit c , die Wellenlänge des Lichts λ und dem Planck'schen Wirkungsquantum h [14]:

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (2.1)$$

Dieser *elektronische Übergang* auf ein höheres Energieniveau erfolgt binnen $\sim 10^{-15}$ s. Die Elektronen verweilen anschließend nur kurz in diesem Zustand (typischerweise 10^{-8} s) [98], bevor sie unter aussenden eines Photons in den Grundzustand zurückkehren. Das emittierte Licht weist dabei meist eine höhere Wellenlänge auf als das eingestrahlte Licht. Diese Verschiebung wird als *Stokes Shift* bezeichnet [99]. Um diese Zusammenhänge zu verdeutlichen, wird im Folgenden genauer auf die Bewegung der Atomkerne des Moleküls während eines Anregungsprozesses eingegangen.

Im Vergleich zum Atomkern bewegen sich die leichten Elektronen um ein Vielfaches schneller, weshalb ein elektronischer Übergang in wenigen Femtosekunden geschieht. Der Atomkern ändert seine Position während eines Anregungsprozesses nicht und wird als ruhend angenommen [98] [100] [101]. Dies wird durch die *Born-Oppenheimer-Näherung*

beschrieben. Daraus resultiert die getrennte Betrachtung der Bewegung von Elektronen und Kernen. Die Lage der Kerne eines zweiatomigen Moleküls in Abhängigkeit der Energie kann somit als Potentialkurve für den Grundzustand und den angeregten Zustand dargestellt werden, siehe Abbildung 2.5 [102].

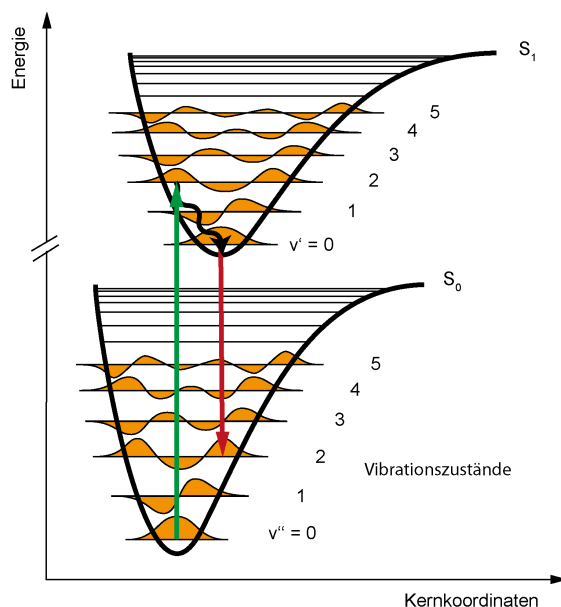


Abbildung 2.5: Franck Condon Prinzip. Der elektronische Übergang zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand durch optische Anregung verläuft vertikal. Das Elektron kehrt aus dem niedrigsten Vibrationszustand des elektronisch angeregten Zustands S_1 in den Grundzustand S_0 zurück. Die vertikalen Übergänge zwischen den beiden Zuständen sind durch die farbigen Pfeile illustriert. Das emittierte Photon verfügt über eine niedrigere Frequenz als das Anregungslicht. Abbildung nach [103].

Diese Potentialkurven beider Zustände werden wiederum in mehrere Vibrationszustände unterteilt [104] [105]. Bei Raumtemperatur befinden sich die Elektronen im elektronischen Grundzustand S_0 als auch meist im niedrigsten Vibrationsgrundzustand [106]. Durch Aufnahme eines Photons gelangt ein Elektron aus dem elektronischen Grundzustand in einen höheren energetischen Zustand. Analog zur Born-Oppenheimer-Näherung besagt das sogenannte *Franck-Condon-Prinzip* vor diesem Hintergrund, dass Übergänge zwischen den vibronischen Zuständen stets vertikal zur Kernkoordinate erfolgen [107]. Durch die Trägheit der Atomkerne während des Anregungsprozesses ist ein elektronischer Übergang zwischen den Vibrationswellenfunktionen des Grund- und des angeregten Zustands wahrscheinlich, wenn der Überlapp dieser Wellenfunktionen besonders groß ist [106] [107] [108]. Das angeregte Elektron hält sich in diesem wahrscheinlichsten Vibrationsniveau nur sehr kurz auf. Es erfolgt zunächst eine strahlungslose Schwingungsrelaxation des Moleküls in den energetisch niedrigsten Vibrationszustand. Das Molekül gibt während dieser Entspannung Energie in

Form von Wärme an die Umgebung ab. Die darauffolgende Emission eines Photons erfolgt stets aus dem energieärmsten Niveau eines elektronischen Zustands (Kashas Regel) [109]. Aufgrund des *Franck-Condon-Prinzips* kehrt das Molekül bevorzugt in ein Vibrationsniveau des Grundzustands mit einer ähnlichen Vibrationswellenfunktion zurück. Die Wellenlänge der Fluoreszenz ist somit höher als die des Anregungslichts, wodurch deren spektrale Trennung ermöglicht wird. Das Molekül erfährt letztlich eine strahlungslose Relaxation in den niedrigsten Vibrationszustand des elektronischen Grundzustands. Dieser Zustand wird als *Singulett Zustand* bezeichnet, wenn die Eigendrehimpulse der Elektronenpaare, die sogenannten *Spins*, antiparallel ausgerichtet sind [110]. Für die parallele Ausrichtung des Spins wird von *Triplett-Zuständen* gesprochen [111]. Am wahrscheinlichsten sind Übergänge zwischen Zuständen gleicher Spinquantenzahl, weshalb diese auch als erlaubte Übergänge bezeichnet werden. In optisch angeregten Systemen treten weniger häufige, sogenannte verbotene Übergänge dennoch auf. Sie resultieren in der Änderung der Spinzustände (Änderung der Multiplizität) und dem Übergang des Elektrons aus einem Singulett- in einen Triplett-Zustand [111]. Zur Vereinfachung werden diese Zusammenhänge durch das folgende Jablonski-Diagramm in Abbildung 2.6 dargestellt.

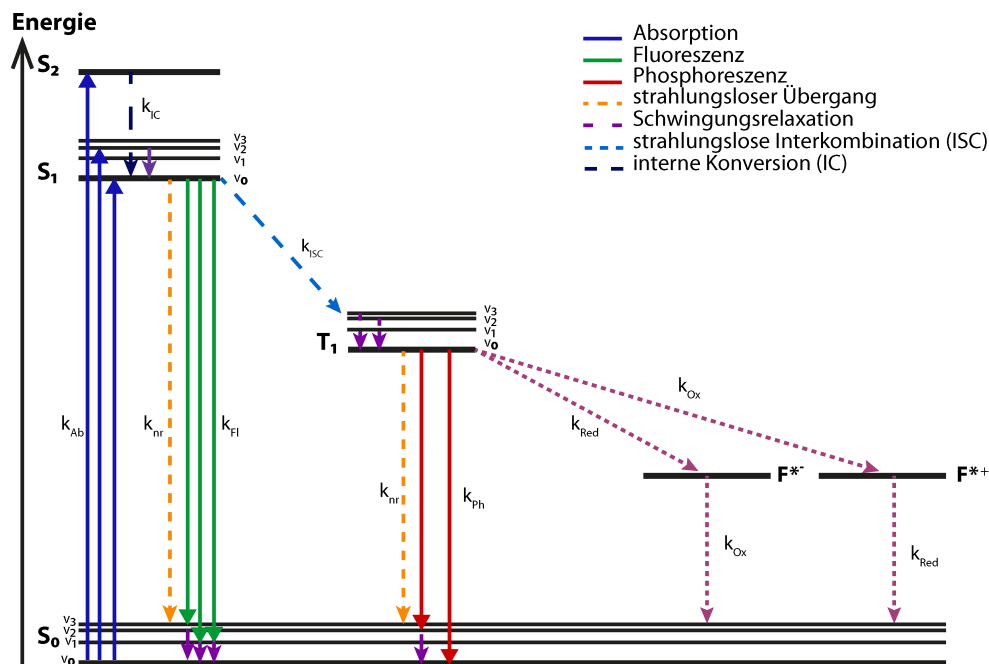
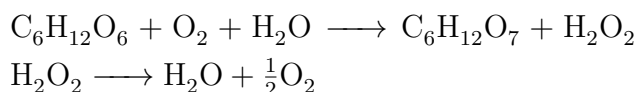


Abbildung 2.6: Jablonski Diagramm. Ein Elektron gelangt durch Einstrahlung von Licht aus seinem Grundzustand (S_0) in den angeregten Zustand (S_1). Von dort gelangt es unter Aussendung eines Photons größerer Wellenlänge zurück in den Grundzustand. Dieses Phänomen wird als Fluoreszenz (grüne Pfeile) bezeichnet. Das Elektron gelangt unter Aussenden eines Photons aus dem Triplett-Zustand in den Grundzustand. In diesem Fall ist von Phosphoreszenz die Rede (rote Pfeile). Dieser Zustand kann durch reduzierte und oxidierte Radikalzustände entvölkert werden (rechts).

Zunächst befindet sich das Molekül im energetisch niedrigsten, dem Grundzustand S_0 [14] [98]. Durch Einstrahlung von Licht gelangt ein Elektron auf ein energetisch höheres Niveau (S_1), vergleiche Abbildung 2.6. Innerhalb der elektronischen Niveaus tritt eine strahlungslose Schwingungsrelaxation des Elektrons in den energetisch niedrigsten Vibrationszustand auf. Erfolgt eine Relaxation zwischen unterschiedlichen elektronischen Energieniveaus (beispielsweise von S_2 nach S_1), wird von der internen Konversion (IC) gesprochen. Das Elektron verliert während dieser Entspannung Energie in Form von Wärme [98] [100] [107]. Das Molekül emittiert bei der anschließenden Rückkehr in den Grundzustand Licht höherer Wellenlänge (*Stokes Shift*) [99].

Die Relaxation zurück in den Grundzustand S_0 kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen: Aus dem S_1 erfolgt die Rückkehr in den Grundzustand S_0 durch die Abgabe eines neuen Photons (*Fluoreszenz*) und durch strahlungslose Prozesse (k_{nf}), siehe Abbildung 2.6. Die Entvölkerung des S_1 Zustands kann ebenso über den Triplett-Zustand T_1 erfolgen. In diesen gelangt das Elektron durch die sogenannte strahlungslose Interkombination (ISC) und kann sich dort einige Millisekunden aufhalten. Der Grund für die Langlebigkeit des T_1 liegt in der Änderung der Spinmultiplizität und somit der Änderung des Spinzustandes eines Elektrons, die bei diesem verbotenen Übergang erfolgt [111] [112] [113]. Während sich das Molekül im Triplett-Zustand befindet, kann es nicht erneut zur Fluoreszenz angeregt werden, sodass von einem *Dunkel-* oder *Aus-Zustand* gesprochen wird [114] [115]. Die Entvölkerung des Triplett-Zustands wird durch Wechselwirkung mit dem in Lösung befindlichen Sauerstoff beschleunigt, wodurch das Elektron letztlich unter erneuter Spinänderung und Emission eines Photons in den Grundzustand (*Phosphoreszenz*) gelangt [112]. Dabei entstehen Sauerstoffradikale, welche das π -Elektronensystem des Fluorophors zerstören und ihm so die Fähigkeit rauben, erneut in den angeregten Zustand zu gelangen [116]. Um dieses physikalische Photobleichen zu verhindern, wird der Sauerstoff der Lösung mittels enzymatischen Reaktionen entzogen. Das gängigste System besteht aus Glukose-Oxidase und Katalase sowie Glukose als Substrat [117]. Dabei erfolgt zunächst die Umsetzung der Glukose und des Sauerstoffs (O_2) durch die Glukose-Oxidase zu Gluconsäure. Das dabei zusätzlich entstehende Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird in einer zweiten Reaktion durch die Katalase zu Wasser umgesetzt. Die entsprechende Reaktionsgleichung ist im folgenden gezeigt:



Durch den Sauerstoffentzug wird die Lebensdauer des Triplett-Zustands jedoch verlängert und weniger Elektronen kehren in den Grundzustand zurück. Zur Stabilisierung des Signals gilt es den Fluoreszenzfarbstoff wieder den Grundzustand zu überführen [113]. Dazu können

unterschiedlichste Oxidations- und Reduktionsmittel verwendet werden (**R**educing and **O**xidizing **S**ystem (ROXS)) [118] [119]. In dieser Arbeit wird Ascorbinsäure als Reduktionsmittel und Methylviologen als Oxidationsmittel eingesetzt. Die durch die Ascorbinsäure gebildeten Radikalanionen können durch das Methylviologen wieder oxidiert werden [120]. Durch diesen zweiten Schritt kann der Grundzustand S_0 wieder bevölkert werden [113], siehe Abbildung 2.6 rechts.

2.2.2 Superauflösungsfluoreszenzmikroskopie

Um biologische Feinstrukturen im Größenbereich von unter 200 nm mit höchster Auflösung untersuchen zu können, war die Elektronenmikroskopie maßgeblich daran beteiligt die Grundkenntnisse über den Aufbau von Zellstrukturen zu erhalten [5] [121]. Diese Methode lässt sich nur eingeschränkt auf die direkte Beobachtung biologischer Prozesse anwenden, da sie im Vakuum arbeitet und hohe Strahlendosen verwendet. Diese Umstände forderten die Weiterentwicklung der konventionellen Lichtmikroskopie. Die hochaufgelöste Darstellung von Proben im biomolekular relevanten Bereich schien aufgrund des *Abbe Limits* nicht umsetzbar [5]. Die von Ernst Abbe beschriebene Auflösungsgrenze eines gewöhnlichen Lichtmikroskops, siehe Gleichung 2.2, bestimmt die Auflösungsgrenze auf die Hälfte der Wellenlänge λ des sichtbaren Lichts [122]. Das Abbe'sche Gesetz besagt, dass sich zwei Objekte nur dann scharf getrennt voneinander wahrnehmen lassen, wenn sie mindestens einen Abstand d von 200–300 nm zu einander aufweisen [122] [123]:

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \alpha} = \frac{\lambda}{2 \cdot NA} \quad (2.2)$$

Der Brechungsindex n des Mediums und der halbe Öffnungswinkel des Objektivs α lassen sich durch die Numerische Apertur (NA) zusammengefasst ausdrücken. Eine höhere Auflösung kann prinzipiell erreicht werden, wenn der halbe Öffnungswinkel des Objektivs α und/oder der Brechungsindex n des Mediums, welches das Objekt umgibt, vergrößert wird. Zusätzlich kann Strahlung mit niedrigerer Wellenlänge und damit höherer Energie angewendet werden [121] [124]. Da der Brechungsindex n und der halbe Öffnungswinkel des Objektivs nicht beliebig einstellbar und biologische Proben empfindlich gegenüber hohen Energien sind, bleibt die begrenzte Auflösung für die optische Mikroskopie bestehen [104].

Ende der 1990er Jahre gelang es einigen Wissenschaftlern um Stefan Hell mit Hilfe der *Stimulated Emission Depletion* Methode das Beugungslimit zu überwinden. Die Einführung und Entwicklung verschiedener Konzepte der Fluoreszenzmikroskopie erlaubte eine Auflösung im Nanomaßstab und ermöglichte die Umgehung der bis dahin als Dogma geltenden Beugungsgrenze. Das essentielle Element für die Auflösung zweier fluoreszierender Objekte,

die weniger als 200 nm voneinander entfernt sind, ist das geschaltete Detektieren ihres jeweiligen Signals. So kann die Position von einem Molekül nach dem anderen mit hoher Präzision bestimmt werden. Sie nutzen fluoreszierende Moleküle (Fluoreszenzfarbstoffe), die sich durch verschiedene Techniken gezielt anregen und abschalten lassen. So werden die zu untersuchenden Objekte nacheinander betrachtet und ermöglichen eine Rekonstruktion eines Bildes, in dem Objekte mit Abständen im Nanometerbereich sichtbar sind. Die beiden geläufigsten Konzepte der Superauflösungsmikroskopie kennzeichnen sich durch die Nutzung der gezielten Schaltung in den Dunkelzustand (z.B. STED Mikroskopie) oder der stochastischen zeitlich sequentiellen Schaltung von Molekülen (z.B. (F)PALM und (d)STORM) [8] [21] [22] [23]. Superauflösung sowie die superaufgelöste Rekonstruktion basierend auf stochastischem Schalten und Auslesen impliziert, dass sich die Mehrheit der Moleküle im Dunkelzustand befindet und die Population der fluoreszierenden Moleküle dadurch gering ist. Fluoreszieren einige Moleküle wird das abgebildete Signal mittels einer Verteilungsfunktion beschrieben, deren Zentrum genauestens lokalisiert werden kann [8] [21] [22]. Abbildung 2.7 zeigt dieses Prinzip schematisch.

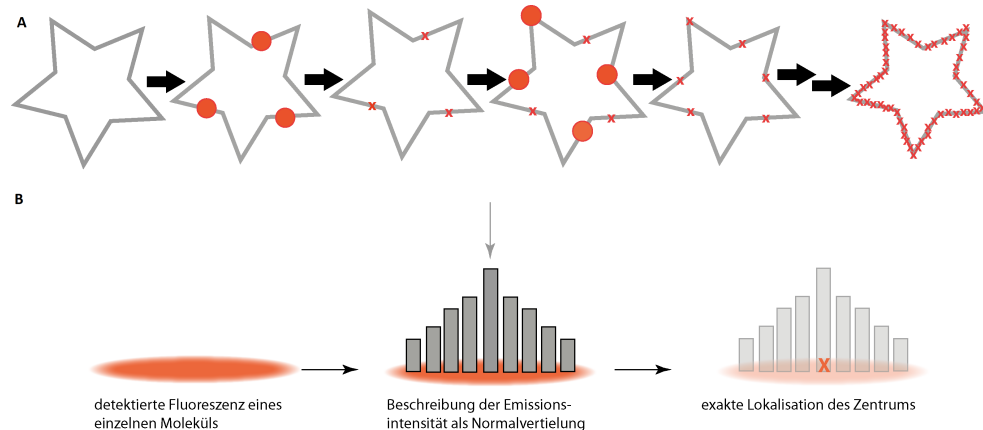


Abbildung 2.7: Vereinfachtes Prinzip der Superauflösungsmikroskopie. A: Unterschiedliche Fluorophore der Probe werden in mehreren Zyklen angeregt. Aus der beugungsberendzten Aufnahme wird das Zentrum des Lichtfleckes bestimmt. Aus diesen wird letztlich das superaufgelöste Bild rekonstruiert. B: Die Abbildung der Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls wird als breiter Punkt dargestellt. Die Emissionsintensität der Fluoreszenz wird durch eine Verteilungsfunktion angepasst, deren Maximum die exakte Position des Moleküls wiedergibt.

Die zuletzt genannte zeitlich sequentielle Anregung fluoreszierender Moleküle wird auch als *Lokalisationsmikroskopie* bezeichnet. Deren Sachverhalt soll aufgrund der Nutzung in dieser Arbeit im Folgenden genauer beschrieben werden. Die Lokalisationsmikroskopie wird an einem Weitfeld-Aufbau durchgeführt und beruht auf der Detektion von punktförmigen Objekten mittels **E**lectron **M**ultiplying **C**harge-**C**oupled **D**evice (EMCCD)-Kameras [5]

[125]. Die damit aufgenommenen Bilder fluoreszierender punktförmiger Strukturen sind Beugungsmuster [126]. Jeder Objektpunkt erzeugt aufgrund der Wellennatur der Lichtausbreitung in der lateralen Bildebene eine *Airy-Scheibe* [5]. Diese besteht aus einem hellen Zentrum umgeben von konzentrischen Ringen, deren Intensitätsprofil nach außen hin abnimmt [127]. Diese Helligkeitsverteilung hängt von der *Punktspreizfunktion* (**P**oint **S**pread **F**unction (PSF)) ab. Die Halbwertsbreite (**F**ull **W**idth **H**alf **M**aximum (FWHM)) der PSF wird oft als erreichbare Auflösung angegeben [128]. Das Intensitätsprofil der PSF wird in ausreichend guter Näherung mit einer zweidimensionalen Gauß-Funktion beschrieben [125] [129], siehe Gleichung 2.3:

$$f(x,y) = A \exp -\frac{1}{2} \left(\left(\frac{x - x_0}{\sigma_x} \right)^2 + \left(\frac{y - y_0}{\sigma_y} \right)^2 \right) \quad (2.3)$$

Deren Maximum entspricht der wahrscheinlichsten Position des fluoreszierenden Moleküls [104] [129]. Nachdem ein Bild aufgenommen wurde, werden die analysierten Fluorophore in den *Aus-Zustand* überführt und neue, an anderen Orten befindliche Moleküle eingeschaltet. Dieser Prozess wiederholt sich mehrere Male [15] [125]. Das finale superaufgelöste Bild wird rekonstruiert, indem alle detektierten Fluorophor-Positionen übereinander gelegt werden. Zur Anregung der Fluorophore wird die Interne Totalreflektionsfluoreszenz (**T**otal **I**nternal **R**eflection **F**luorescence (TIRF)) Mikroskopie verwendet [48]. Das anregende Laserlicht trifft hierbei in einem flachen Winkel auf die Glasoberfläche der Probenkammer, sodass das gesamte Licht reflektiert wird (Totalreflektion) [5]. Ein elektromagnetisches Feld, das sogenannte *evaneszente Feld*, breitet sich in eine schmale Schicht von 100–200 nm der Probe über dem Glas aus. Aufgrund der exponentiell abfallenden Lichtintensität werden nur die Moleküle angeregt, die sich innerhalb dieser Schicht und somit in unmittelbarer Nähe zur Glasoberfläche befinden [130]. Dadurch wird unter anderem die Hintergrundfluoreszenz der Moleküle in Lösung minimiert [10]. In folgender Abbildung 2.8 ist das oben beschriebene Phänomen schematisch illustriert.

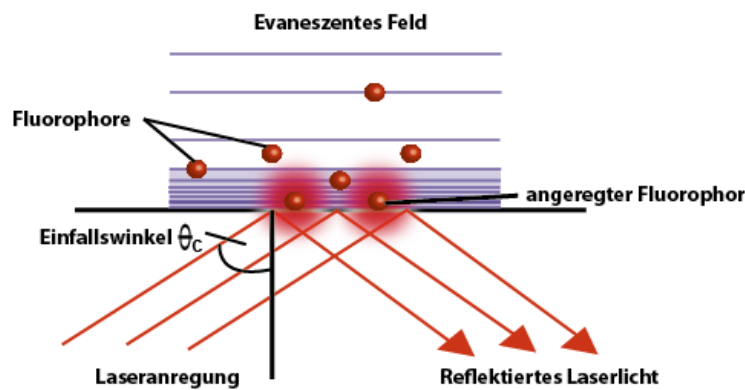


Abbildung 2.8: Prinzip der Totalreflektion. Die in einem bestimmten Winkel auf die Glasoberfläche treffenden Laserstrahlen werden vollständig reflektiert. Es entsteht ein evaneszentes Feld oberhalb der Glasoberfläche, das sich in einer schmalen Schicht in der Probe ausbreitet. In diesem Bereich von 100–200 nm werden die Moleküle angeregt.

Die Präzision der Lokalisierung wird im Wesentlichen durch die Anzahl der Photonen N bestimmt [129]. Sie wird durch folgende Gleichung 2.4 beschrieben:

$$\sigma_{lok} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \times \frac{1}{\sqrt{N}} \quad (2.4)$$

Dementsprechend sind die unterschiedlichen Lokalisationsmikroskopietechniken darauf ausgelegt, den sich wiederholenden An-Zustand der Fluorophore auf kurze Zeitabschnitte zu begrenzen und über die Gesamtdauer der Detektion möglichst viele Photonen zu generieren [104] [131]. Die verschiedenen etablierten Methoden unterscheiden sich vornehmlich durch die Methodik zum Schalten der Moleküle [8] [21] [132]. Sie verbindet jedoch, dass sie Fluorophore schalten, welche permanent mit der Probe verbunden sind. Im Laufe des Detektionsprozesses können diese bleichen, was zum Verlust von Photonen führt, welche aber für die Lokalisierungsgenauigkeit essentiell sind. Eine Methode, die im folgenden Kapitel 2.2.2.1 vorgestellt wird, umgeht dieses Problem. Sie nutzt die Affinität von Fluoreszenzfarbstoffen zu einem bestimmten Material und ist nicht an die photochemische Generierung von An- und Aus-Zuständen gebunden.

2.2.2.1 PAINT und DNA-PAINT Mikroskopie an DNA-Origami Nanostrukturen

Im Jahr 2006 wurde ein Vorgehen vorgestellt, das keine photochemischen Prozesse nutzt, um eine begrenzte Anzahl fluoreszierender Moleküle für die Superauflösungsmikroskopie zu realisieren [27]. Die als Punktanhäufung zur Bildgebung von Topographien im Nanomaßstab (PAINT) bezeichnete Methode basiert auf dem stochastischen Binden und Abbinden diffundierender fluoreszierender Marker, die kontinuierlich lokalisiert werden, sobald sie mit dem entsprechenden zu untersuchenden Objekt (zum Beispiel Lipiddoppelschichten

und verschiedene Liposomen) interagieren. Emittiert lediglich ein Fluorophor Licht, kann dieser mittels zweidimensionaler Gauß-Funktion mit hoher Genauigkeit lokalisiert werden. Das Abbinden oder Bleichen des Fluorophors beendet die Lokalisierung. Die Wiederholung dieses Prozesses erlaubt die Rekonstruktion des supraaufgelösten Bildes [27] [52].

In dieser Arbeit wird eine spezielle Erweiterung dieser Methode genutzt, welche als DNA-PAINT bezeichnet wird [10] und vielfältig eingesetzt werden kann [29] [52] [71] [133]. In dieser Arbeit werden speziell DNA-Origami Nanostrukturen genutzt, um ein spezifisches Binden zu ermöglichen [52]. Die zu untersuchende DNA-Origami Nanostruktur wird dabei nicht direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Sie verfügt hingegen über eine oder mehrere kurze einzelsträngige DNA-Sequenzen (*docking strands*), die aus ihr heraus ragen. Die dazu komplementären farbstoffmarkierten Sequenzen (*Imager*) werden der Lösung dazu gegeben, sodass diese bedingt durch die Hybridisierung der Stränge eine Lokalisierung ermöglichen [10] [11] [48]. So kann der *Imager* in Abhängigkeit der Länge der komplementären Sequenzen (üblicherweise 8-10 Nukleotide) für eine gewisse Zeit (Millisekunden bis Sekunden) an die *docking strands* binden [10]. Durch dieses Prinzip gelangen stets neue Fluorophore zu den Anbindestellen, sodass quasi kein Photobleichen der untersuchten Stelle wie bei permanent gebundenen Molekülen auftritt [11]. Eine zusätzliche Besonderheit ruht im Imagerstrang selbst, da er Guaninbasen enthält. Dies resultiert, während er sich in Lösung befindet, in einer teilweisen Auslöschung der Fluoreszenz des Farbstoffes und somit zu einer signifikanten Reduktion des Hintergrundrauschens [134]. Das Prinzip von DNA-PAINT ist in der folgenden Abbildung 2.9 dargestellt [52].

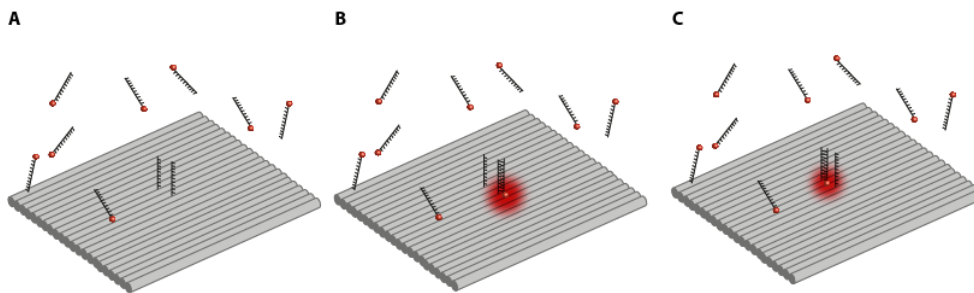


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung von DNA-PAINT nach [52]. A: Schematische Darstellung des DNA-Origami mit in Lösung befindlichen *Imager* Strängen. Hybridisiert keiner der farbstoffmarkierten Stränge an den *docking strand* der Nanostruktur, wird keine Fluoreszenzemission detektiert. B und C: Sobald ein farbstoffmarkierter Strang an einen der komplementären Stränge bindet, wird dieser durch das evaneszente Feld angeregt und ein Fluoreszenzsignal kann detektiert werden.

Theoretisch ist die erreichbare Auflösung lokalisationsbasierter Mikroskopiemethoden nicht durch eine bestimmte Grenze festgelegt. Dies bedeutet allerdings nicht, dass es in der praktischen Anwendung keine Faktoren gibt, welche die räumliche Auflösung begrenzen [43].

Dazu zählen die Anzahl an detektierten Photonen N pro Molekül, siehe Gleichung 2.4, die Anzahl der *docking strands* oder Farbstoffmoleküle, die an der Probe angebracht sind und das Verhältnis zwischen An- und Aus-Zustand. Je mehr Photonen pro Bild und somit in der Gesamtheit der Messung detektiert werden, desto besser die räumliche Auflösung [135]. In diesem Zusammenhang steht auch die Anzahl an *docking strands* oder Farbstoffmolekülen. Je höher diese ist, desto mehr Photonen können generiert werden [136]. Zu beachten ist, dass die Punktlichtquelle mit zunehmender Zahl von Anbindesträngen eine Eigenbreite erhält, die sich auf die Abstandsbestimmung auswirken kann. Eine gute Probe sollte ein geringes Verhältnis zwischen An- und Aus-Zustand aufweisen, um möglichst viele Moleküle pro An-Zustand im beugungsbegrenzten Bereich aufnehmen zu können [113]. Neben diesen Faktoren hat jedoch die Verschiebung der Probe, der sogenannte *Drift*, den größten Einfluss auf die erzielbare räumliche Auflösung [43]. Dabei bewegt sich die Probenkammer inklusive der darin befestigten Probe vom Objektiv weg. Durch diese Verzerrung ändert sich die Position der Fluoreszenzfarbstoffe über den Zeitraum der Messung und das final erstellte superaufgelöste Bild wird „verschmiert“. Mittlerweile sind diverse Hilfsmittel wie Quantum dots vorhanden, die den Probendrift korrigieren können [137]. Neben mechanischem/technischem Equipment (siehe Kapitel 3.2.1) stehen auch biologische Proben für die Driftkorrektur zur Verfügung. Würfelförmige mit Farbstoffen oder *docking strands* versehene DNA-Origami Nanostrukturen, die als Referenzmarker bei Superauflösungsmessungen zugefügt werden, gewährleisten eine präzise und zuverlässige Driftkorrektur. Solche *Beads* oder *Fiducial Marker* [138] werden in dieser Arbeit verwendet. In Kombination mit einer speziellen Analysesoftware helfen diese, die laterale Verschiebung der Probenkammer zu korrigieren [43] [138].

Die neusten Entwicklungen der DNA-PAINT Technik erlauben inzwischen multiple Anwendungen. Eine räumliche Auflösung von 5 nm ist mit einer Lokalisationsgenauigkeit von 1 nm bereits erreicht worden [42]. Zusätzlich erweitern diverse Modifikationen das Einsatzgebiet von DNA-PAINT fortlaufend [52] [139] [140] [141] [142]. Dazu zählt die Darstellung von Strukturen durch mehrere Farben oder die Betrachtung von Proben im dreidimensionalen Raum [29]. Auch die in dieser Arbeit betrachtete erweiterte Darstellung des Proteins HFQ kann zu einem neuen Anwendungsbereich für DNA-PAINT gezählt werden. Darüber hinaus kann für die Untersuchung von feinen Zellstrukturen bereits die sogenannte *Expansion Microscopy* eingesetzt werden. Dabei wird die Probe in ein quellbares Polymer eingebettet. Dieses vergrößert sich und die darin enthaltene Struktur um einen gewissen Faktor, sodass die Superauflösungsmikroskopie bei beugungsbegrenzten Mikroskopen zum Einsatz kommen kann [143].

2.2.3 Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)

Die Energieübertragung nach Theodor Förster beruht auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen eines angeregten Farbstoffes (*Donor*) mit einem Farbstoff im Grundzustand (*Akzeptor*) [98]. Dieses Phänomen tritt immer dann auf, wenn das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt und sich beide Fluorophore in unmittelbarer Nähe (1 nm bis 10 nm) zueinander befinden [98] [144]. Durch die Einstrahlung von Licht wird ein Elektron des Donor-Farbstoffmoleküls in den angeregten Zustand überführt. Statt ein Photon abzugeben und in den Grundzustand zurückzukehren, kann die Energie strahlungslos auf das in nächster Nähe befindliche Akzeptor-Farbstoffmolekül übertragen werden. Aus dem angeregten Zustand des Akzeptors gelangt das Elektron unter Aussendung eines Photons in dessen Grundzustand zurück [98]. Dies wurde 1948 von Theodor Förster theoretisch beschrieben [36] und ist in Abbildung 2.10 vereinfacht veranschaulicht.

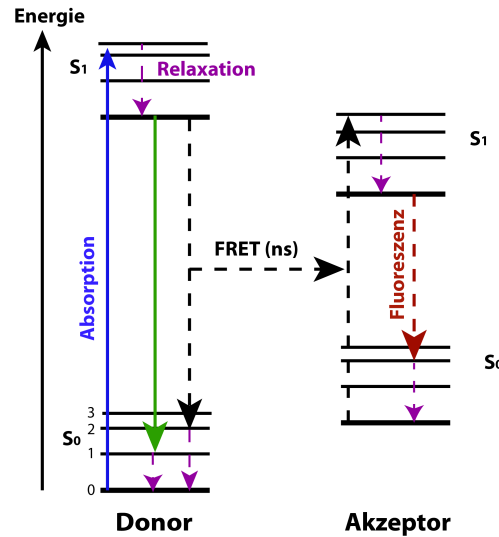


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung von FRET. Durch Absorption eines Photons gelangt der Donor in den angeregten Zustand. Ist ein Akzeptor in unmittelbarer Nähe, erfolgt die Übertragung der Anregungsenergie. Der Akzeptor gelangt unter Ausstrahlung von Fluoreszenz in seinen Grundzustand zurück. Die Dauer der strahlungslosen Energieübertragung beträgt wenige Nanosekunden (ns).

Die Wahrscheinlichkeit der Energieübertragung zwischen Donor zu Akzeptor ist unter anderem abhängig von deren Abstand zueinander. Diese Transferrate k_T wird mittels Fermi's Goldener Regel bestimmt [145]:

$$k_T = \frac{9 \cdot \Phi_D \cdot \ln(10) \cdot \kappa^2 \cdot J}{128\pi^5 \cdot \tau_D \cdot n^4 \cdot N_A} \cdot \frac{1}{r^6} \quad (2.5)$$

Diese Regel betrachtet die Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors (Φ_D),

die Übergangsdipolmomente der Fluorophore zueinander (κ^2), den spektralen Überlapp zwischen Emission des Donors und Absorption des Akzeptors (J), die Lebensdauer des Donor- S_1 -Zustands (τ_D), den Abstand zwischen Donor und Akzeptor (r) sowie den Brechungsindex n des Mediums als auch die Avogadro Konstante (N_A). Werden die Konstanten zusammen gefasst, ergibt sich die *Förstersche Formel*, siehe Gleichung 2.6 [146]:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \cdot \left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad (2.6)$$

Gleichung 2.6 beinhaltet neben der Lebensdauer (τ_D) und dem Abstand r den Försterradius R_0 . Bei diesem Abstand beträgt die Energieübertragungseffizienz (E) 0,5. Der Försterradius R_0 ist für jedes Donor-Akzeptor-Paar zu bestimmen [36] [145]. Die Effizienz E , die den Anteil übertragener Energie vom Donor auf den Akzeptor bestimmt, kann durch Transferraten ausgedrückt und mit Gleichung 2.6 zusammenfasst werden. Die FRET-Effizienz E ist in Gleichung 2.8 beschrieben [146] [147]:

$$E = \frac{k_T}{\tau_D^{-1} + k_T} \quad (2.7)$$

$$= \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (2.8)$$

Einsetzen von Gleichung 2.6

Der Prozess hängt mit sechster Potenz vom Abstand ab und sinkt beziehungsweise steigt durch diesem Zusammenhang rapide [148] [149]. In einem Bereich von 2–10 nm ist es möglich, FRET zu beobachten, wobei die Effizienz mit zunehmendem Abstand kleiner wird. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 2.11 illustriert.

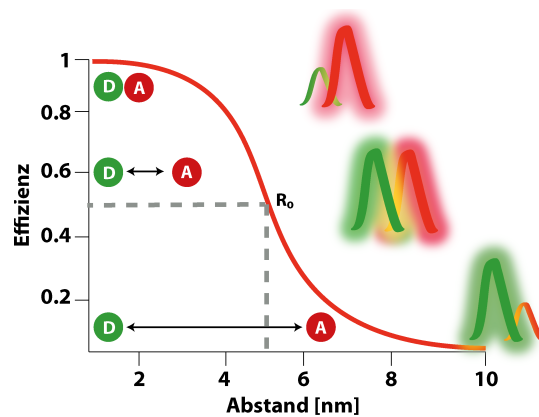


Abbildung 2.11: Zusammenhang des Energieübertrags und des Abstands. Mit zunehmendem Abstand verringert sich die Effizienz der Energieübertragung. Der Försterradius R_0 entspricht dem Abstand, bei dem 50 % der Energie übertragen wird.

Besonders sensitiv ist die Bestimmung eines Abstands nahe dem Förster-Radius R_0 . Im Grenzbereich für die minimale und maximale FRET-Ausbeute hingegen ändert sich die FRET-Effizienz kaum. Mit steigendem Abstand sinkt der Energieübertrag und der angeregte Donor emittiert das aufgenommene Photon selbst in Form von Fluoreszenz. Durch diese starke Abhängigkeit des Abstands zwischen Donor und Akzeptor zählen FRET-Experimente mittlerweile zu den am häufigsten genutzten Fluoreszenzmikroskopietechniken [150]. Die Beobachtung von Konformationsänderungen und dynamischen Prozessen an einzelnen Molekülen und Komplexen wird mit Hilfe dieser Technik möglich [150]. Eine der bekanntesten Objekte für experimentelle strukturelle Beobachtungen ist die *Holliday Junction* [151]. Diese Struktur aus DNA formt ein Kreuz aus vier Untereinheiten. Spezifische Stellen der DNA wurden gezielt mit einem Donor und Akzeptor markiert. Bewegen sich die markierten Untereinheiten nun voneinander fort oder aufeinander zu, ähnlich einer sich öffnenden oder schließenden Schere, ändert sich die Effizienz der Energieübertragung [151]. Die Energieübertragung wird nicht nur vom Abstand des FRET-Paares bestimmt. Auch die Größe des Überlapps der jeweiligen Emissions- und Absorptionsspektren trägt entscheidend zum FRET bei [148]. Für das in dieser Arbeit verwendete Donor-Akzeptor-Paar *ATTO[®]542* und *Abberior STAR RED* ist der spektrale Überlapp in folgender Abbildung 2.12 dargestellt.

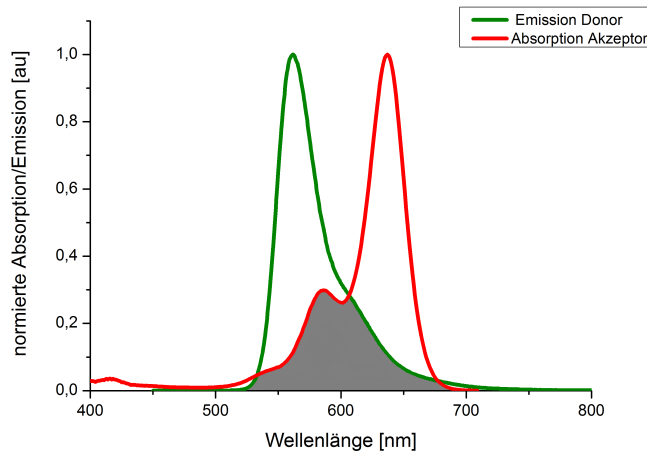


Abbildung 2.12: Spektraler Überlapp der in dieser Arbeit genutzten Farbstoffe. Gezeigt sind das Emissionsspektrum des Donors *ATTO[®]542* sowie das Absorptionsspektrum des Akzeptors *Abberior STAR RED*. Der Bereich, in dem sich beide Spektren überlappen, wird als spektraler Überlapp bezeichnet und ist hier in grau dargestellt.

Zur Bestimmung des in Abbildung 2.12 grau dargestellten spektralen Überlapps wurde das *Überlappintegral* J berechnet, siehe Gleichung 2.9:

$$J = \int F_D \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad (2.9)$$

Die Integration erfolgt über das Produkt des flächennormierten Emissionsspektrums des Donors (F_D), des Extinktionskoeffizienten des Akzeptors ε_A und der vierten Potenz der Wellenlänge. Je größer das Überlappintegral desto höher der mögliche Energietransfer. Dies wird für die Bestimmung des Förster-Radius' benötigt, der wie bereits erwähnt für jedes FRET-Paar zu bestimmen ist. Der Förster-Radius lässt sich anhand der Formel 2.10 ermitteln [150]:

$$R_0 = \sqrt[6]{8,8 \cdot 10^{-28} \text{mol}^{-1} \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot J \cdot n^{-4}} \quad (2.10)$$

Formel 2.10 beinhaltet neben dem Überlappintegral J , der Quantenausbeute des Donors Φ_D und dem Brechungsindex des Mediums ($n=1,33$ für Wasser) auch die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente (κ^2) zu einander [148] [152]. κ^2 kann theoretisch Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Stehen beide Übergangsdipolmomente der Fluorophore kollinear zueinander, findet der Energietransfer mit höchst möglicher Effizienz für diesen Abstand statt, κ^2 beträgt hier 4. Für zwei frei rotierende Fluorophore wird ein Wert von $2/3$ angenommen [150] [153] [154].

Experimentell wird die FRET-Effizienz aus dem Intensitätsverhältnis zwischen Donor ohne (I_{DD}) und mit Akzeptor (I_{DA}) bzw. aus der Fluoreszenzlebensdauer des Donors in An- (τ_{DA}) und Abwesenheit (τ_{DD}) des Akzeptors nach Gleichung 2.11 bestimmt:

$$E = 1 - \left(\frac{I_{DA}}{I_{DD}} \right) = 1 - \left(\frac{\tau_{DA}}{\tau_{DD}} \right) \quad (2.11)$$

Für die experimentelle Durchführung von FRET-Experimenten wird häufig, so auch in dieser Arbeit, die *alternierende Laseranregung* (**A**lternating **L**aser **E**Xcitation (ALEX)) genutzt [155]. Bei dieser Methode wird schnell zwischen den Anregungslasern für Donor und Akzeptor hin- und her gewechselt, wobei die Fluoreszenz beider Moleküle separat detektiert wird. Dies hat den Vorteil, dass mit einem Donor-/Akzeptor-markierte Proben oder doppelt markierte Proben unterschieden werden können. Der erste Laser regt den Donor direkt an und kann, im Falle von FRET, den Akzeptor indirekt in den angeregten Zustand überführen [155]. Gleichzeitig kann auch die Emission eines einzelnen Donormoleküls detektiert werden. Durch den Wechsel auf den zweiten Anregungslaser wird der Akzeptor direkt angeregt. In Summe liefert die Analyse einer Probe mittels ALEX drei Fluoreszenzintensitäten, die zur Bestimmung des FRET-Werts herangezogen werden können [155] [156]. Durch den spektralen Überlapp von Donor und Akzeptor kommt es zu diversen Phänomenen, die den gemessenen FRET-Wert verfälschen und entsprechend korrigiert werden müssen [157]. Eines dieser Phänomene ist die *direct excitation*. Reicht das Absorptionsspektrum des Akzeptors bis zur Wellenlänge des Anregungslasers des Donors, kann dieser den Akzeptor ebenfalls direkt anregen. Dadurch wird ein Akzeptorsignal detektiert, welches nicht durch

FRET bedingt wird. Die *direct excitation* ist linear von der detektieren Intensität des Akzeptorsignals abhängig und wird durch den Korrekturfaktor α ausgedrückt [158].

Reicht das Emissionsspektrum des Donors bis in das Emissionsspektrum des Akzeptors, wird die Emission des Donors als Akzeptorsignal detektiert. In diesem Fall ist von *cross talk* die Rede [158], dessen Einfluss auf den FRET-Wert durch den Korrekturfaktor β reduziert werden kann [159].

Ein weiterer Korrekturfaktor passt das Detektionssignal zwischen Donor und Akzeptorsignal an. Die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe emittieren in Abhängigkeit ihrer Quantenausbeute und der Detektionseffizienz unterschiedlich viele Photonen, was durch den γ -Wert angeglichen wird [157] [160].

Die einzelnen Korrekturfaktoren ergeben sich aus der experimentellen Ausführung von FRET mittels ALEX, weshalb für deren Bestimmung auf Kapitel 3.2.1.4 verwiesen sei.

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel soll zunächst die Vorgehensweise zur Gestaltung, Herstellung und Aufreinigung einer DNA-Origami Nanostruktur erläutert werden. Daraufgehend sind Methoden zur Prüfung und Bewertung der oben genannten Schritte beschrieben. Nachdem die DNA-Origamis für die optischen Messungen vorbereitet wurden, wird auf die verwendete Messapparatur und die Methoden zur Auswertung der erhaltenen Daten eingegangen. Die verwendeten Chemikalien und Geräte werden, sofern nicht zuvor beschrieben, im Anhang A.3 gesondert gelistet.

3.1 Herstellung von DNA-Origamis

3.1.1 *caDNA*

Das frei zugängliche Programm *caDNA* ermöglicht die einfache und schnelle Prozessierung von dreidimensionalen DNA-Origami Nanostrukturen. Es verfügt über eine zweidimensionale Benutzeroberfläche, mit der verschiedenste räumliche Designs kreiert werden können [161]. Das Programm verwendet eine vereinfachte Darstellung mit mehreren Helices, die eine bessere Orientierung innerhalb des *Scaffolds* während des Designprozesses ermöglicht. Nachdem die gewünschte Struktur erstellt worden ist, werden die *staple strands* in den *Scaffold*-Strang gelegt. Mittels *caDNA* wurde die Position der *staple strands* als auch deren Basenabfolge in tabellarischer Form ausgegeben, vergleiche Kapitel 2.1.2. Die Position eines Stranges wurde dabei durch die Helices als auch die Basenposition bestimmt, gezeigt in folgender Tabelle 3.1:

Tabelle 3.1: *staple strands* Details

Start	Ende	Sequenz (5'-3')
19 [192]	21 [191]	ATTATACTAAGAAACCACCAGAAGTCAACAGT

Zunächst gibt *caDNA* Start- und Endhelix sowie in Klammern dahinter die entsprechende Basenposition an. Im gegebenen Beispiel der Tabelle 3.1 begann der Strang auf Helix 19 bei Base 192 und endete auf Helix 21 eine Basenposition verschoben. Neben der Basensequenz werden zusätzlich deren Länge und ein Farbcode angegeben, hier nicht gezeigt. Durch

veränderte Farbgebung können in der *caDNA*no Datei zukünftige Modifikationen leicht identifiziert und unterschieden werden. Eine Modifikation in Form zusätzlicher Nukleotide, eines Farbstoffs oder Vitamins wird letztlich durch das Anfügen am entsprechenden Ende der Sequenz integriert. Die vollständige tabellarische Auflistung der verwendeten *staple strands* sowie der diversen Modifikationen findet sich im Anhang A.2.

3.1.2 Verwendete DNA-Nanostruktur

Das in dieser Arbeit genutzte rechteckige DNA-Origami (**N**ew **R**ectangular **O**rigami (NRO)) [11] ist eine Modifikation des Rothemund DNA-Origamis [45]. Durch Verringerung der inneren Spannung ist dieses DNA-Origami planarer als das Original [49]. In der *caDNA*no Datei ergibt sich ein Rechteck aus 24 Helices mit je 287 Basenpaaren, das etwa 90 nm lang und 70 nm breit ist. Das in dieser Arbeit verwendete rechteckige DNA-Origami verfügt über sechs Modifikationen mit Biotin am jeweiligen 5'-Ende des entsprechenden *staple strand*. Weiterhin wurden Verlängerungen und Farbstoffe am 3'-Ende bestimmter Stränge hinzugefügt, um die Anwendung von DNA-PAINT sowie FRET-Messungen zu ermöglichen. Das Design für den Abstand von 6 nm ist beispielhaft in der folgenden Abbildung 3.1 illustriert.

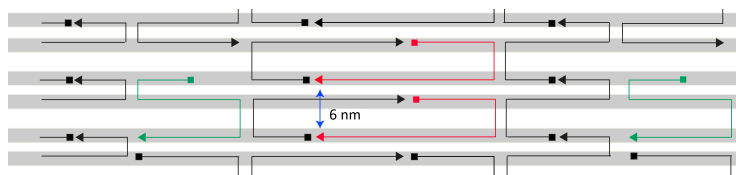


Abbildung 3.1: Design des 6 nm Abstands in *caDNA*no. Rot gefärbte Stränge zeigen jene, deren 3'-Ende (Pfeilspitze) um eine bestimmte Sequenz verlängert wird. Grün dargestellt sind die Stränge, die ein Biotin am 5'-Ende (Rechteck) tragen. In grau sind die DNA-Helices gezeigt, welche zur vereinfachten Darstellung in *caDNA*no verwendet werden.

In Abbildung 3.1 sind die zukünftigen Modifikationen für einen Abstand von 6 nm durch rot eingefärbte Stränge gezeigt. In grün sind zwei der sechs Biotin-Modifikationen dargestellt. Modifikationen für die Abstandsbestimmung sind stets zwischen den zentral im DNA-Origami befindlichen Biotinmolekülen angebracht. Dadurch sind die Modifikationen planar positioniert, sodass keine gravierenden Abweichungen zwischen den berechneten und den gemessenen Abständen zu erwarten sind. Um die Biotinmoleküle zur Unterseite des DNA-Origamis zeigen zu lassen, sind die Stränge am 5'-Ende entsprechend verkürzt worden. Die jeweiligen Enden des DNA-Strangs wurden durch eine Pfeilspitze (3'-Ende) und ein Rechteck (5'-Ende) symbolisiert. Die Abstände wurden stets von einer Pfeilspitze zur nächsten bestimmt. Für einen Abstand von 6 nm werden zwei Helices à 2 nm übersprungen, die jeweils durch einen 1 nm breiten Spalt getrennt werden, vergleiche Abbildung 3.2.

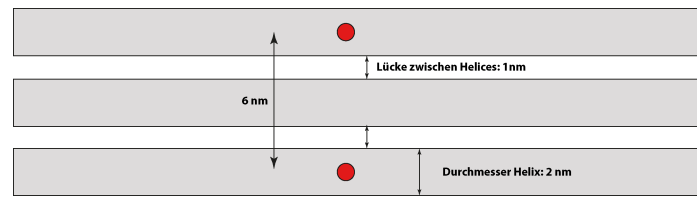


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des 6 nm Abstands. Rot gefärbte Kreise zeigen die Verlängerung am 3'-Ende. In grau ist die DNA-Helix gezeigt, auf der die Verlängerungen platziert wurde. Eine Helix ist etwa 2 nm breit und 1 nm von der benachbarten Helix entfernt.

Zusätzlich wurden zwei weitere Abstände auf dem DNA-Origami etabliert. Um diese zu generieren, wurde die in Raab et al. [11] verwendete Nanostruktur genutzt. Die dort bereits markierten Stränge für den Abstand von 6 nm galten als Orientierungs- und Ausgangspunkte für die Bestimmung der zu modifizierenden Stränge. Um die Verlängerungen erfolgreich aus dem DNA-Origami herausragen zu lassen, ist die Orientierung der Stränge zu beachten. Diese Vorgabe schränkte die Auswahl möglicher Anbindestränge maßgeblich ein. Grundsätzlich ist es möglich die Sequenzen der *staple strands* in einem DNA-Origami zu verlängern oder zu kürzen, siehe Kapitel 3.1.1. Dabei ist jedoch die Windung der DNA-Helix zu beachten. Kürzungen bzw. Verlängerungen würden im ungünstigsten Fall dazu führen, dass Anbindestränge in benachbarte Helices ragen. Der komplementäre *Imager*-Strang könnte nicht hybridisieren, wodurch die Durchführung eines Experimentes nicht gelingt. Die Auswahl möglicher Positionen musste zusätzlich in einem Bereich erfolgen, der durch FRET als auch DNA-PAINT vermessen werden konnte, was die Generierung neuer Abstände zusätzlich beschränkte. Die einzig wählbare Position, die sich zwischen den bereits gezeigten Biotin-Strängen und zusätzlich im Bereich zur Realisierung beider Messmethoden befand, lag zwischen den in Abbildung 3.2 bestehenden Positionen. Schematisch ist dies in Abbildung 3.3 dargestellt.

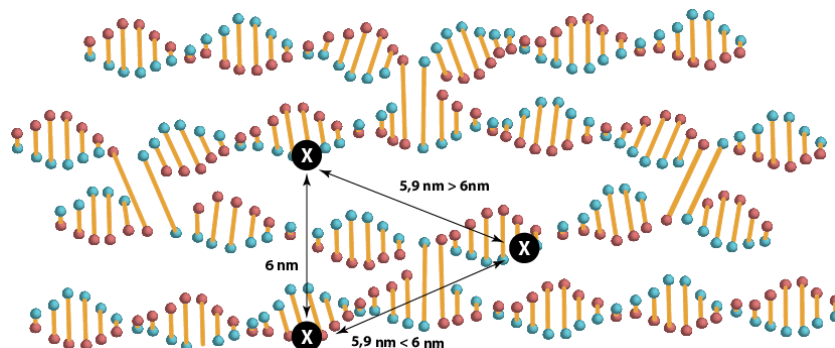


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des 5,9 nm Abstands. Schwarz gefärbte Sphären zeigen die Verlängerung am 3'-Ende. In rot und blau ist die DNA-Helix gezeigt, auf der die Verlängerungen platziert wurden. Weiterhin sind die *crossover* visualisiert, die zwischen den modifizierten Strängen liegen.

Für den in Abbildung 3.3 gezeigten theoretischen Abstand von 5,9 nm sind jeweils eine Helix à 2 nm übersprungen worden. Durch die horizontale Platzierung 15 Basen à 0,34 nm verschoben zur ersten Verlängerung ergibt sich die Form eines gleichseitigen Dreiecks. Mit dem Satz des Pythagoras [162] ließ sich die entsprechende Distanz ermitteln. Daraus ergeben sich drei nahezu identische Abstände. Durch die Verbindung zwischen den unteren beiden benachbarten DNA-Strängen, dem sogenannten *crossover*, kommt es möglicherweise zu einer Verzerrung der Abstände. Durch den crossover werden die unteren benachbarten Stränge zusammen gezogen und die oberen benachbarten Stränge weiter von einander entfernt, sodass jeweils ein Abstand über und unter 6 nm zu erwarten ist. Der Einfluss der crossover auf die Form der DNA wurde bereits in [163] beobachtet.

Nachdem die gewünschten Stränge lokalisiert waren, wurde eine passende Sequenz zur Verlängerung an das geeignete Ende angefügt. Die jeweiligen Stränge sind an ihrem 3'-Ende um 12 Nukleotide für DNA-PAINT-Experimente verlängert worden. Die entsprechende Sequenz lautet:

5'-TTA AAT GCC CG-3'

Die ersten Thymin-Nukleotide dienen als *Spacer*, die einen gewissen Raum zwischen dem anbindenden Farbstoffmolekül und dem DNA-Origami gewährleisten. So werden Effekte wie die teilweise Auslöschung der Fluoreszenz durch Guaninbasen, siehe Kapitel 2.2.2.1, vermieden. Die entsprechend komplementäre Sequenz trägt an ihrem 3'-Ende den Farbstoff *Abberior STAR RED* (siehe Kapitel 3.1.6.3). Dieser bindet an die komplementäre Sequenz des *docking strands* und ermöglicht durch die zeitweise Hybridisierung die DNA-PAINT Messungen.

Für die Durchführung der FRET-Experimente wurden die identischen Positionen mit folgenden Sequenzen entsprechend verlängert:

5'-TTT TCC TCT ACC ACC TAC ATC AC-3'

5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'

Um je ein Donor- als auch Akzeptormolekül an die Verlängerungen zu hybridisieren, wurden unterschiedliche Sequenzen gewählt. Die multiple Thymin-Sequenz interagiert mit dem *Abberior STAR RED* (3'-Ende) markierten komplementären Strang. Zur erstgenannten Sequenz ist der mit *ATTO[®]542* (3'-Ende) markierte *Imager* komplementär.

Die genaue Abfolge der Sequenzen findet sich im Anhang A.2.

Die entsprechenden DNA-Origami Nanostrukturen wurden für die Vermessung mittels DNA-PAINT und FRET und den jeweiligen Abstand hergestellt. So konnte der gleiche

Messaufbau zuverlässig für beide Messmethoden etabliert werden.

Zeigen sich außerdem mit der Theorie korrelierende Ergebnisse, kann die entsprechende Zuverlässigkeit der jeweiligen Methode bestätigt werden.

Weiterhin soll, wie in Kapitel 2.1.3 erwähnt, die native Struktur des HFQ-Proteins durch supraauflösende Darstellung entsprechend abgebildet werden. Da sich das Protein möglichst zwischen den Biotin-Modifikationen befinden sollte, wurden die bereits in Abbildung 3.1 verwendeten Stränge als Orientierungs- bzw. Ausgangspunkt verwendet. Die dortige Position ist zu einem gewissen Grad resistent gegen über einer Verbiegung der DNA-Origami Nanostruktur im Falle variierender Salzkonzentrationen [49]. Ausgangspunkt für die Positionsbestimmung der Verlängerung ist die Sequenz, die neben dem linken Biotin-Strang liegt, siehe Abbildung 3.1 und Anhang A.2. Diese wird für die geometrische Betrachtung im Folgenden als „Position 1“ bezeichnet. Die übrigen modifizierten Stränge werden dem Uhrzeigersinn folgend nummeriert. Das Design des NRO sollte nicht maßgeblich im bestehenden Konzept verändert werden. Dadurch waren teilweise keine Stränge wählbar, die in unmittelbarer Nähe der vorgesehenen Proteinposition lagen. Zur Verbindung des Proteins mit den ausgewählten Positionen erfolgte eine zusätzliche Verlängerung der Stränge um mehrere Thymin-Nukleotide (Poly T). Das in *caDNA* entsprechend erstellte Design sowie die Auflistung der sechs Verlängerungen findet sich im Anhang A.1 und A.2. An einer der kurzen Seiten des Rechtecks werden zusätzliche Verlängerungen angebracht. Diese 22 Nukleotide langen Stränge werden für die Superauflösungsmessung und Darstellung des Proteins nicht benötigt, sondern dienen als Indikator der Nanostruktur. Nach der eigentlichen Herstellung des NRO werden komplementäre fluoreszenzfarbstoffmarkierte Nukleotide an die Indikator-Stränge hybridisiert. Dieses Vorgehen wird als *externes Labeling* bezeichnet. Durch das externe Labeling besteht die Möglichkeit nach der DNA-PAINT Messung ein beugungsbegrenztes Bild aufzunehmen. Dieses kann anschließend in der Auswertesoftware mit dem supraaufgelösten Bild übereinander gelegt werden. Im Idealfall liegen die supraaufgelösten Strukturen unmittelbar auf denen des beugungsbegrenzten Bilds. Durch diese sogenannte *Kolokalisierung* kann sichergestellt werden, dass die supraaufgelösten nativen Strukturen des HFQ-ähnlichen Proteins mit dem NRO verbunden sind und ausschließlich diese für die spätere Analyse ausgewählt werden.

Nach Kapitel 2.1.3 lag das Protein durch eine *Click-Chemie Reaktion* an jedem Monomer mit 33 Nukleotiden vor. Von diesen sind 12 für die DNA-PAINT Anbindung vorgesehen. Sie bilden das 3'-Ende der Gesamtsequenz. Die übrigen 21 Nukleotide werden zur Verknüpfung mit dem DNA-Origami verwendet. Die DNA Sequenz, welche an das Protein mit Hilfe der Click-Reaktion gekoppelt wird, ist in Abbildung 3.4 gezeigt.

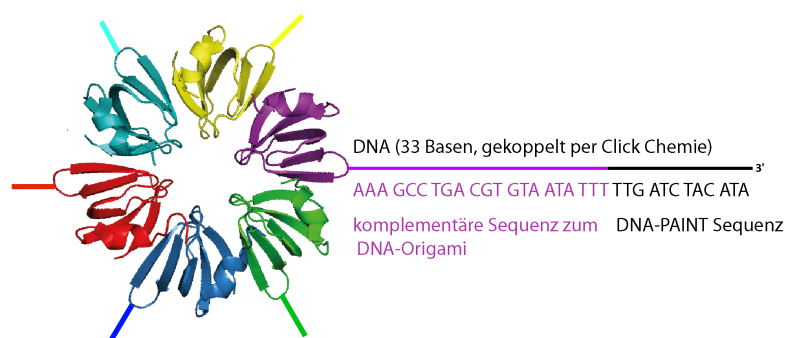


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des mit DNA modifizierten Proteins. An die modifizierten Monomere des Proteins (hier in unterschiedlichen Farben dargestellt) wird eine 33 Nukleotide lange einzelsträngige DNA gekoppelt. Zur besseren Übersicht ist hier lediglich eine dieser Sequenzen (violett und schwarz) gezeigt. Die an die übrigen Monomere gekoppelten Sequenzen sind durch die entsprechende Farbe angedeutet. Die DNA-Sequenz selbst wird benötigt, um das Protein mit dem DNA-Origami zu verknüpfen (dargestellt durch die violette komplementäre Sequenz). Eine Sequenz von 12 Nukleotiden wird als Anbindestelle für den DNA-PAINT *Imager* verwendet (schwarz).

An jede Untereinheit des HFQ-Proteins wird je ein DNA-Einzelstrang gekoppelt. Zur vereinfachten Darstellung ist in Abbildung 3.4 lediglich eine Sequenz gezeigt, die sowohl dazu dient das Protein auf dem DNA-Origami zu binden als auch die Abbildung mittels supraauflösender Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen. Die Abbildung der Originalstruktur kann durch DNA-PAINT nur eingeschränkt realisiert werden, da die Darstellung von sechs einzelnen Punkten auf einem Durchmesser von 6 nm technisch noch nicht umsetzbar ist. Die Untersuchung der allgemeinen Form des Proteins durch die hier vorgenommene Erweiterung erlaubt hingegen die Durchführung von DNA-PAINT.

Vorangegangene Kontrollexperimente zeigten, dass sechs *docking strands* zur Hybridisierung von mehr als einem Protein führen (gezeigt in Kapitel 4.5.1). Dies würde bei Durchführung der Superauflösungsmikroskopie zur Darstellung von mehr als einem Protein pro Nanostruktur führen und irreführende Resultate liefern. Um die Bindung mehrerer Proteine auszuschließen, wurden fünf *docking strands* auf 12 Nukleotide gekürzt, lediglich „Position 1“ verfügt über die vollen 21 Nukleotide. Dieser dient zum Fixieren des Proteins und wird daher im Folgenden als *capture strand* bezeichnet. Die Bindung ist dabei stark genug, um ein Ablösen des Proteins vom NRO durch Spülvorgänge zu verhindern. Letzteres gilt nicht für die verkürzten Stränge. Sie dienen als Hilfs- bzw. Haltestränge, um das Protein planar und gerichtet auf die Nanostruktur zu immobilisieren. So wird eine Konkurrenz um die einzig dauerhafte Anbindeposition erreicht, die wiederum gewährleistet, dass lediglich ein Protein pro NRO gebunden ist. Veranschaulicht wird dies in Abbildung 3.5. Sie zeigt die

Immobilisierung des Proteins auf dem NRO sowie die theoretisch ermittelten Abstände und das erwartete Ergebnis der Superauflösung.

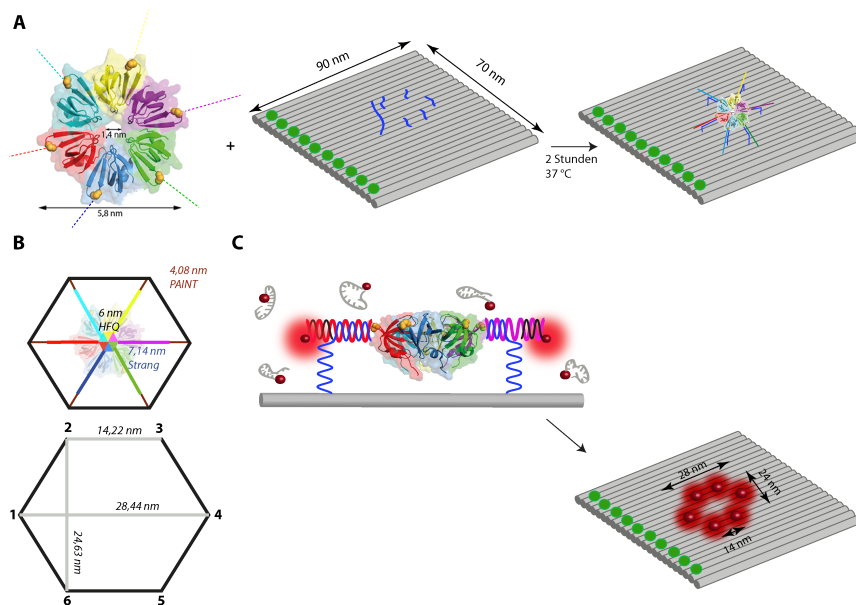


Abbildung 3.5: Abmessungen des HFQ-Proteins und Immobilisierung auf einer DNA-Origami Nanostruktur. A: Schematische Darstellung des HFQ-Proteins und des NRO mit entsprechenden Verlängerungen (blau) sowie den externen Farbstoffen zur Kolokalisierung (grün). Zur Bindung eines Proteins je Nanostruktur ist der *capture strand* länger als die fünf weiteren Stränge. B: Übersicht der Abstände, die mittels Immobilisierung des Proteins erreicht werden. C: Schematische Darstellung einer DNA-PAINT-Messung. Die *Imager* binden an die komplementären Sequenzen. Werden idealerweise alle sechs Positionen abgebildet, ergibt sich eine hexagonale Ringstruktur.

Wie in Abbildung 3.5 A gezeigt, verfügt das Protein im Idealfall über sechs einzelsträngige DNA-Sequenzen, die an die komplementären Stränge der DNA-Origami Nanostruktur hybridisieren. Die Stränge des DNA-Origamis hybridisieren nicht mit den Verlängerungen am Protein, die für DNA-PAINT vorgesehen sind. Sie bleiben als Überhang unbesetzt und können den später zugegebenen *Imager*-Strang binden. Abbildung 3.5 B zeigt die sich ergebenden Abstände, die durch Superauflösungsexperimente visualisiert werden sollen. Der Durchmesser des Proteins fließt mit 6 nm in die Berechnung ein. An jedes Monomer ist im Idealfall ein Strang mit 33 Nukleotiden gekoppelt, was einer Länge von 11,22 nm entspricht. Im Falle einer planaren Immobilisierung gleicht die entstehende Form einem gleichseitigen Hexagon. Dessen mathematische Zusammenhänge wurden für Bestimmung der zu erwartenden Abstände verwendet [162]. Die Distanz von „Position 1“ zu „Position 4“ beträgt insgesamt 28,44 nm. Die kurzen Seiten des Hexagons, beispielhaft durch „Position 2“ und „Position 3“ gezeigt, verfügen über einen Abstand von 14,22 nm zu einander. Eine weitere Distanz wird zwischen „Position 2“ und „Position 6“ bzw. „Position 3“ und „Position

5“ zu 24,63 nm bestimmt. Diese drei Abstände werden als Ergebnisse der DNA-PAINT-Messungen erwartet. Das Prinzip ist in Abbildung 3.5 C dargestellt. Die *Imager*-Stränge binden kurzzeitig und mehrfach an den entsprechend komplementären Abschnitt, der als Überhang aus dem Protein ragt. Werden alle sechs Stränge abgebildet, wird ein Erscheinen nach Abbildung 3.5 C erwartet. Die einzelnen Spots lassen sich nicht mehr getrennt voneinander auflösen, sondern zeigen sich als homogene Ansammlung, die ähnlich eines Donuts über ein Loch in der Mitte verfügt. Eine hohe Genauigkeit der Lokalisation eines einzelnen Fluoreszenzfarbstoffs, eine geringe Anzahl an falschen Lokalisierungen und eine sorgfältige Driftkorrektur sind beispielhafte Einflussfaktoren, die eine adäquate Abbildung beeinflussen können [164]. Die genaue Anbindeposition des Proteins an die fünf *docking strands* ist nicht gesamtheitlich zu kontrollieren. Das Protein kann zwar fest gebunden sein, jedoch nicht ideal abgebildet werden, wenn beispielsweise nur vier von sechs Strängen gebunden haben. Weiterhin kann nicht davon ausgegangen werden, dass jedes Protein vollständig mit einzelsträngiger DNA modifiziert ist, was beispielsweise durch unspezifische Reaktionen mit freien Thiolen bedingt wird [165]. Durchaus sind weniger DNA-PAINT Anbindestellen vorhanden, sodass die idealisierte Donutform vergleichsweise selten zu beobachten sein wird. Wahrscheinlicher ist die Abbildung von Strukturen mit geringerer Labeling-Dichte. In vorausgegangenen Kontrollexperimenten wurde die Kopplungseffizienz einzelsträngiger DNA an das Protein untersucht. Dazu ist an jedes Monomer eine Sequenz mit dem Farbstoff *ATTO[®]647* am 5'-Ende gekoppelt worden. Die entsprechenden Ergebnisse sind im Kapitel 4.6 gezeigt.

Stimmen die Resultate optisch durch die Kolo-kalisation und Strukturabbildung sowie hinsichtlich der Abstände durch die Auswertung der DNA-PAINT-Messung mit den erwarteten Resultaten überein, ist eine erfolgreiche planare Immobilisierung des Proteins auf die DNA-Origami Nanostruktur wahrscheinlich. Die Herstellung eines mit DNA-Einzelsträngen modifizierten Proteins zur Vermessung mittels DNA-PAINT wird nachfolgend in Kapitel 3.1.3 beschrieben.

3.1.3 Herstellung eines modifizierten HFQ-Proteins

Die DNA-konjugierten HFQ-ähnlichen Proteine wurden von Dina Grohmann und ihren wissenschaftlichen Mitarbeitern am Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie, Lehrstuhl für Mikrobiologie hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt, vergleiche Kapitel 2.1.3. Für das ausführliche Herstellungsprotokoll sei an entsprechende Stelle [79] verwiesen.

3.1.4 Hybridisierung eines DNA-Origamis

Die verwendeten modifizierten und unmodifizierten *staple strands* für das Grundgerüst des DNA-Origamis wurden von der Firma **eurofins Genomics** bezogen. Die modifizierten als auch unmodifizierten Stränge wurden im Synthesemaßstab 0,05 µmol erworben. Diese Stränge bildeten zusammen mit dem *Scaffold* das NRO. Der *Scaffold* selbst wurde in der AG Tinnefeld hergestellt. Verwendet wurde der sogenannte *p7249* aus dem Bakteriophagen M13mp18 (7.249 Nukleotide) [166]. Da der *Scaffold*-Strang nicht eigenständig angefertigt wurde, wird hier nicht weiter auf den Herstellungsprozess eingegangen. Es sei auf entsprechende Literatur verwiesen [49].

Um diverse Modifikationen in die Nanostruktur einzufügen, wurden die unmodifizierten Stränge durch die entsprechenden modifizierten Oligonukleotidstränge ersetzt.

Für die Hybridisierung des NRO lag die Endkonzentration des *Scaffold* bei 25 nM. Die unmodifizierten Stränge wurden dem gegenüber im zehnfachen Überschuss zugegeben. Die modifizierten Biotinstränge und die jeweiligen Verlängerungen (*docking strands*) lagen in dreißigfachem Überschuss gegenüber dem *Scaffold* vor. Diese Komponenten wurden in einem Faltungspuffer (1x TAE (bestehend aus 40 mM TRIS, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, 12 mM MgCl₂ und 300 mM NaCl), 12 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂)) zu einem Endvolumen von 40 µL zusammengeführt. Diese Zusammensetzung erhöhte die Wahrscheinlichkeit der korrekten Hybridisierung einzelner Nanostrukturen. Eine genaue Auflistung der verwendeten Komponenten findet sich im Anhang A.4.

Die in einem Eppendorfgemisch zusammengeführten Bestandteile wurden anschließend mit Hilfe eines Thermocyclers (VWR **peqlab**) in einem kontrollierten Heiz-/Kühlprogramm hybridisiert. Dazu heizte das Gerät die Probe zunächst auf 70 °C. Diese Temperatur ist für 5 Minuten konstant gehalten worden. So konnte sichergestellt werden, dass bei Raumtemperatur gebildete Doppelstränge dissoziieren und alle DNA-Bestandteile als Einzelstrang vorliegen. Anschließend erfolgte die schrittweise Abkühlung der Probe um jeweils ein Grad pro Minute bis zu einer Endtemperatur von 20 °C. Diese Temperatur wurde bis zur Entnahme der Probe konstant gehalten. Durch das schrittweise Abkühlen konnten die DNA-Stränge mit hoher Wahrscheinlichkeit an die komplementären Stellen im *Scaffold* hybridisieren. Die Gesamtzeit zur Herstellung des NRO betrug etwa 60 Minuten. Im Anschluss wurden die hybridisierten DNA-Origami Nanostrukturen von überschüssigen Strängen, wie im folgenden Kapitel 3.1.5 beschrieben, befreit.

3.1.5 Aufreinigungsmethoden für DNA-Origami Nanostrukturen

Die Trennung der gewünschten Nanostrukturen von überschüssigen *staple strands* erfolgte über die Gelelektrophorese, die nach Größe und Ladung der Strukturen trennt. Für eine solche wurde eine wässrige Lösung aus 1,5 % Agarose und 0,5-fachem TAE-Puffer hergestellt.

Diese ist zum Sieden gebracht worden, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach einer kurzen Abkühlphase wurde der Lösung MgCl_2 ($c=11\text{ mM}$) zu gegeben. Für die Detektion der Nukleinsäuren ist der Lösung der Fluoreszenzfarbstoff **peqGREEN®** im Verhältnis 1:10.000 zugesetzt worden. Diese Lösung wurde anschließend in einen Gelträger gegossen und erstarrte im Rahmen der weiteren Abkühlung. Ein Gelkamm, der zuvor in den Gelträger eingesetzt wurde, sparte in regelmäßigen Abständen rechteckige Kammern eines Volumens von $30\text{ }\mu\text{L}$ aus. Der erstarrte Gelträger wurde anschließend in eine Gelbox überführt. In diese ist ein Puffer aus 0,5% TAE und 11 mM MgCl_2 gefüllt worden, bis das Gel vollständig benetzt war. Im Anschluss wurde der Gelkamm vorsichtig entfernt. In die entstanden Kammern ist die mit einem Ladepuffer (**BlueJuice™**) versetzte DNA-Origami Probe gegeben worden. Die Gelbox befand sich außerdem in einem Eis-Bad, um Schädigung der DNA Nanostruktur durch Hitze (Denaturierung [57]) während der Elektrophorese zu vermeiden. Bei der zweistündigen Laufzeit bei einer Spannung von 70 V entstand ein Stromfluss von circa 100 mA , der zur bereits erwähnten Wärmeentwicklung führt [49]. Die Qualität der Gelelektrophorese ist anschließend mit Hilfe einer UV-Kammer geprüft worden. Dabei wurden die durch **peqGREEN®** gefärbten DNA-Origami Nanostrukturen als Gelbanden sichtbar. Als Orientierungsmarke wurde der *Scaffold* aus der Stock-Lösung zusätzlich in das Gel gegeben. Da die DNA-Origamis sowohl aus *Scaffold* und *staple strands* bestanden und bei korrekter Faltung eine rechteckige Form bilden, waren sie größer als der *Scaffold*. Bedingt durch die Form gelangen die DNA-Origamis weniger weit in das Gel. Die im Überschuss zugegebenen Stränge legten die weiteste Strecke im Gel zurück, da sie nur aus wenigen Nukleotiden bestanden und keine sperrige Form angenommen hatten. Durch die Gelelektrophorese ließen sich die gefalteten DNA-Origami Nanostrukturen leicht von den überschüssigen Strängen abtrennen. Um letztendlich die gewünschten Strukturen aus dem Gel zu befreien, wurde dieses aus dem Gelträger entfernt und unter UV-Licht betrachtet. Ein mit entsprechenden Nanostrukturen beladenes Gel zur visuellen Qualitätskontrolle des Hybridisierungsprozesses ist in folgender Abbildung 3.6 gezeigt.

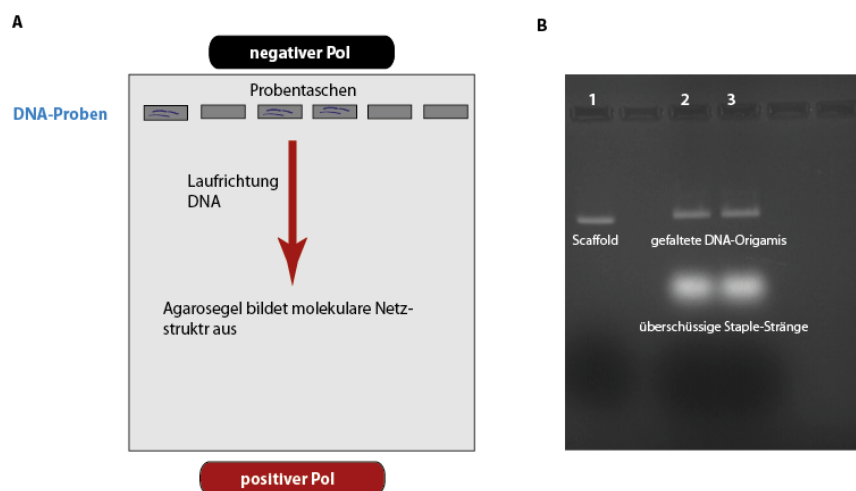


Abbildung 3.6: Darstellung der Gelelektrophorese. A: Schematische Darstellung der Gelelektrophoreseaufreinigung. B: Mittels UV-Licht sichtbare Banden nach der Gelelektrophorese. In Kammer 1 liegt der *Scaffold* als Kontrollbande vor. Diesen als Marker für die visuelle Qualitätskontrolle zu nutzen, ist für die entsprechende Anwendung ausreichend [49]. Die gefalteten DNA-Origamis zeigen sich in den Kammern 2 und 3 als scharfe Banden. Die überschüssigen *staple strands* erscheinen unterhalb der gefalteten Nanostrukturen.

Die entsprechenden Banden wurden vorsichtig mit einer Skalpelklinge ausgeschnitten, weiter zerkleinert und auf ein Stück Parafilm überführt. Auf diesem wurde die flüssige Probe mit einem durch Parafilm geschütztes Deckglas aus dem Gel heraus gedrückt und in ein Probengefäß überführt.

Mit dem *Nanodrop 2000* der Firma **Thermo Fischer** wurde die Konzentration der Probe nach der Aufreinigung bestimmt. Dieses UV-Vis-Spektralphotometer misst die Extinktion der Probe bei 260 nm. Die Konzentration der DNA-Origami Nanostrukturen betrug im Mittel 3 nM. Je akkurater die gefalteten Strukturen aus dem Agarosegel heraus getrennt werden, desto höher ist deren Konzentration. Durch ein unsauberes Heraustrennen gelangen Bestandteile des Gels in das Probengefäß, welche die DNA-Konzentration unzureichend verdünnen.

Für einige Anwendungen war es sinnvoll, höhere Konzentrationen der DNA-Origami Nanostrukturen zu erreichen. Eine Möglichkeit bietet die Fällung der DNA durch

PolyEthylenGlykol (PEG), die gleichzeitig eine weitere Aufreinigungsmethode darstellt. Der hydrophile Polyethylenglycol-Puffer konkurriert mit der DNA um das Hydrationswasser und führt ab einer bestimmten Konzentration zu einer reversiblen Fällung der DNA [167]. Dieser Puffer wird in 1x TAE angesetzt, enthält 12 % (w/v) 8000 PEG, 12 mM MgCl_2 sowie 500 mM NaCl und wird der Probe in gleichem Verhältnis zugegeben. Der Ansatz ist für 30 Minuten bei 4 °C und 16 000 rcf (englisch für *relative centrifugal force*) zentrifugiert worden. Der Überstand wurde anschließend achtsam abgenommen, um das am Boden des

Probengefäß' befindliche DNA-Pellet nicht aufzusaugen und zu verlieren. Das Pellet ist anschließend in einer bestimmte Menge Lagerpuffer (hier meist **Phosphatgepufferte Saline** (PBS) [zusammengesetzt aus 1,98 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl und 137 mM NaCl] mit 10 mM MgCl_2) resuspendiert worden. Die eingesetzte Menge des Puffers bestimmt wiederum die Endkonzentration der Probe.

Sofern die Probe nicht unmittelbar nach der Aufreinigung eingesetzt werden sollte, wurde sie bei -18°C aufbewahrt.

3.1.6 Probenvorbereitung für DNA-PAINT

3.1.6.1 Oberflächenvorbereitung

Als Oberfläche zum Immobilisieren der DNA-Origami Nanostrukturen wurden sogenannte *NuncTM LabTeksTM* der Firma **ThermoFischer** verwendet. Die acht Kammern aus Polystyrol sind auf einem 150 μm dünnen Borosilikat-Deckglas aufgebracht und verfügen über ein Fassungsvermögen von je 1000 μL . Um die *NuncTM LabTeksTM* von jeglichen Verunreinigungen zu befreien, wurden zunächst 200 μL einer 0,1 M Flusssäure (HF) Lösung für 30 Sekunden in die Kammern gegeben. Nach dieser Inkubationszeit und Abnahme der HF wurde jede Kammer dreimal mit PBS gespült. Anschließend ist abermals HF zugegeben und für 5 Minuten inkubiert worden. Dies soll die vollständige Reinigung der *NuncTM LabTeksTM* sicherstellen, Verunreinigungen von der Oberfläche lösen und unerwünschte Interaktionen der DNA-Origamis oder der zur Immobilisierung genutzten Lösungen verhindern. Nach wiederholtem Entfernen der HF und dreimaligem Spülen mit PBS wurden die *NuncTM LabTekTM* Kammern mit 200 μL biotinyliertem **Bovine Serum Albumin** (BSA) (0,5 mg/mL in PBS, **sigma aldrich**) gefüllt und 15 Minuten inkubiert. Die biotinylierte BSA Lösung wurde aus den Kammern entfernt, welche anschließend dreimal mit PBS gespült wurden, um ungebundenes biotinyliertes BSA zu entfernen. Danach sind 200 μL NeutrAvidin (0,5 mg/mL in PBS, **sigma aldrich**) in die *NuncTM LabTekTM* Kammern gegeben worden. Nach erneuter 15 minütiger Inkubation ist die Lösung den Kammern entnommen und dreimal mit PBS gespült worden, um ungebundenes NeutrAvidin zu entfernen.

Die DNA-Origamis wurden in einem Gesamtvolumen von 400 μL zu einer Konzentration von 100 pM auf die vorbereiteten Oberflächen gegeben. Gelöst wurden die DNA-Origami Nanostrukturen in PBS mit 10 mM MgCl_2 . Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Probelösung aus der Kammer entfernt und diese dreimal mit PBS gespült. Eine so für die Messungen vorbereitete Oberfläche ist schematisch in Abbildung 3.7 dargestellt.

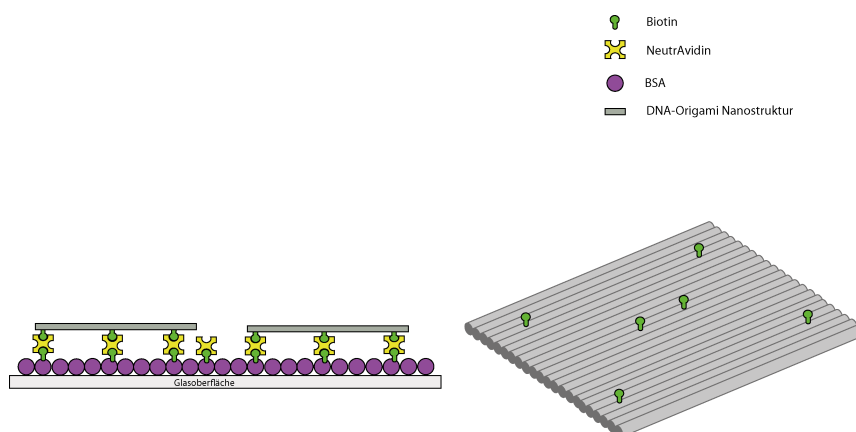


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung einer vorbereiteten Oberfläche für die Messung von DNA-Origami Nanostrukturen. Links ist die vorbereitete Oberfläche mit einem immobilisierten DNA-Origami dargestellt. Der Glasträger verfügt über eine Schicht biotinyliertem BSA (lila Sphären mit grünen Ankern). Darauf bindet das NeutrAvidin (gelb). Dessen vier Bindungstaschen ermöglichen die zusätzliche Kopplung von Biotin (grün), welches auf der Unterseite des DNA-Origamis (rechts) angebracht ist.

In Abbildung 3.7 ist links zunächst die vorbereitete Oberfläche mit einem immobilisierten DNA-Origami gezeigt. Auf dem Glasträger wird nach der Säuberung mit HF eine Schicht aus BSA (lila)/Biotin (grün) zur Passivierung aufgetragen. Das NeutrAvidin (gelb) bindet über eine seiner vier Bindungstaschen an das Biotin. Da dem DNA-Origami Biotinmoleküle über modifizierten Stränge eingesetzt wurden, erfolgt ebenso eine zweite Bindung an das NeutrAvidin [49]. Rechts in Abbildung 3.7 ist die Unterseite des verwendeten DNA-Origamis gezeigt. Vier Biotine befanden sich in den Ecken der Struktur, zwei in deren Mitte. Durch dieses Design ließ sich das DNA-Origami möglichst planar auf der Oberfläche immobilisieren [11].

Durch Zugabe der angemessenen Menge MgCl_2 (10 mM) wurde das DNA-Origami stabilisiert. Die vorbereitete Oberfläche wurde mit einem Gesamtvolumen von 400 μL PBS mit 10 mM MgCl_2 benetzt und konnte über mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden [49].

3.1.6.2 Assemblierung des NRO mit Protein

In 3.1.2 wurde bereits auf die Gestaltung des für diese Arbeit genutzten NRO eingegangen. In diesem Abschnitt wird nun die genaue Vorgehensweise der Assemblierung dieser Nanostruktur mit dem Protein HFQ beschrieben.

Zunächst wurde eine *PEG-Fällung* (Kapitel 3.1.5) zur Aufreinigung nach der Faltung des NRO (Kapitel 3.1.4) durchgeführt. Die Nanostruktur wurde anschließend mit einem dreißigfachen Überschuss von DNA-Einzelsträngen zur Identifikation der DNA-Origami Nanostruktur über Nacht inkubiert. Diese mit einem grünen Farbstoff markierten Stränge

binden permanent an die entsprechenden komplementären *docking strands*, siehe Kapitel 3.1.2. Die überschüssigen, nicht gebundenen Stränge werden mittels Gelelektrophorese abgetrennt. Anschließend wurden das NRO und das Protein im Verhältnis 1:2 in einen 40 μL Ansatz (25 mM **TRIS**(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 200 mM NaCl_2 , 10 mM MgCl_2) überführt und über 120 Minuten bei 37°C in einem Thermocycler (*Thermomixer comfort*) der Firma **Eppendorf** inkubiert. Anschließend kühlte die Probe über ~ 30 Minuten auf Raumtemperatur ab. Nach der Abkühlung wurde der gesamte Ansatz in einer der vorbereiteten *NuncTM LabTekTM* Kammern auf einer BSA-Biotin Oberfläche immobilisiert. Zur Probe ist außerdem ein spezielles DNA-Origami zur Driftkorrektur hinzugegeben gegeben worden. Es handelt sich um einen Referenzpunkt, den sogenannten *Fiducial Marker GATTA-PAINT HIRES 20R*, der Firma **GATTAQUANT GmbH** [138]. Dieser ist ein 20 nm großes würfelförmiges DNA-Origami, das über eine Vielzahl von DNA-PAINT-Anbindestellen verfügen, welche während der DNA-PAINT Messung ebenfalls abgebildet werden. Da sie mit Biotin-Ankern versehen sind, haften sie - wie das zu untersuchende DNA-Origami-Protein-Konstrukt - spezifisch auf der Oberfläche. Der Einsatz des *Fiducial Markers* ermöglicht im Anschluss der Messung eine präzise und zuverlässige softwarebasierte Driftkorrektur. Durch mehrmaliges Spülen mit MilliQ-Wasser werden die nach etwa 20 Minuten nicht gebundenen Strukturen entfernt. Abschließend wird ein Gesamtvolumen von 400 μL (25 mM TRIS, 200 mM NaCl_2 , 10 mM MgCl_2) in die Kammer gegeben. Die so vorbereitete Probe kann bei 4°C mehrere Tage gelagert werden [49].

3.1.6.3 Imagerfarbstoffe

In diesem Kapitel wird eine Übersicht der verwendeten Farbstoffe für die unterschiedlichen Messmethoden gegeben. Diese sind an einzelsträngige DNA gekoppelt, die komplementär zu den *docking strands* der Probe ist. Um die Proben entsprechend der jeweiligen Messung verwenden zu können, muss der entsprechende *Imager* der Lösung zugegeben werden. Die mit Farbstoff markierten Gegenstränge wurden von der Firma **IBA** erworben. Der *ATTO[®]542* wurde von **biomers** bezogen.

DNA-PAINT Als *Imager*-Farbstoff wurden für die DNA-PAINT Messungen dieser Arbeit der *Abberior STAR RED* der Firma **abberior GmbH** verwendet. Gemeinhin ist dieser Farbstoff auch unter der Bezeichnung *KK114* bekannt und wurde bereits als Farbstoff für STED-Experimente erfolgreich eingesetzt [168]. Der *STAR RED* besitzt sein Absorptionsmaximum bei 638 nm (gelöst in PBS, pH 7,4). Das Fluoreszenzmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 655 nm (gelöst in PBS, pH 7,4), während der Extinktionskoeffizient ε in PBS bei gleichen Bedingungen einen Werte von $1,2 \cdot 10^5 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ beträgt. Die Fluoreszenzquantenausbeute η beträgt 90 % bei einer Lebensdauer τ von 3,4 ns. *STAR*

RED kann die Farbstoffe *ATTO*[®]647*N*, *Alexa Fluor*[®]647 oder *Cy5* adäquat ersetzen. Der *STAR RED* ist negativ geladen. Die folgende Abbildung 3.8 zeigt das Absorptions- und Emissionsspektrum des Farbstoff [169].

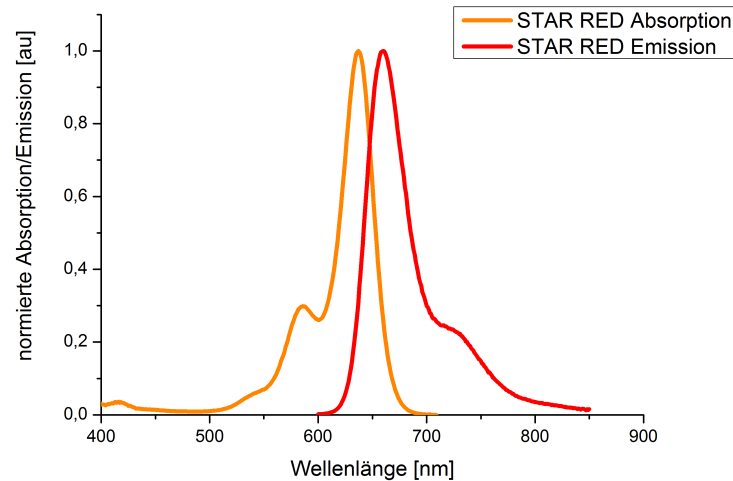


Abbildung 3.8: Fluoreszenzspektrum von *STAR RED*. Die Absorption und Emission sind auf ihr jeweiliges Maximum normiert.

Die zehn Nukleotide langen *Imager*-Stränge waren am 3'-Ende mit dem Farbstoff markiert. Die entsprechende Sequenz lautet:

5'-CGG GCA TTT A-3' *Abberior STAR RED*

Für die DNA-PAINT Messung der Nanometer-Abstände wurde der farbstoffmarkierte Strang in einer Konzentration von 10 nM in die Kammer mit den dort immobilisierten Nanostrukturen gegeben, vergleiche 2.2.1. Um die Anzahl der emittierten Photonen zu erhöhen, wurde ein spezieller Messpuffer verwendet. Dieser bestand aus 1 mM **A**scorbinsäure bzw. **A**cid (AA), 1 mM **M**ethy**V**iologen (MV), 1 % Glukose sowie Glukoseoxidase und Katalase in PBS [170], siehe Kapitel 2.2.1.

Ein weiterer in dieser Arbeit verwendeter Farbstoff ist *ATTO*[®]655. Die zehn Nukleotide langen *Imager*-Stränge waren ebenfalls am 3'-Ende mit diesem Farbstoff markiert. Die entsprechende Sequenz lautet:

5'-CTA GAT GTA T-3' *ATTO*[®]655

Das Absorptionsmaximum liegt bei 663 nm und die maximale Fluoreszenz wird bei einer Wellenlänge von 680 nm emittiert. Der Extinktionskoeffizient ε liegt bei einem Wert von $1,25 \cdot 10^5 \frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ (gelöst in PBS, pH 7,4). Die Fluoreszenzquantenausbeute η beträgt 30 % bei

einer Lebensdauer τ von 1,8 ns [171]. Das normierte Absorptions- und Emissionsspektrum ist in Abbildung 3.9 gezeigt.

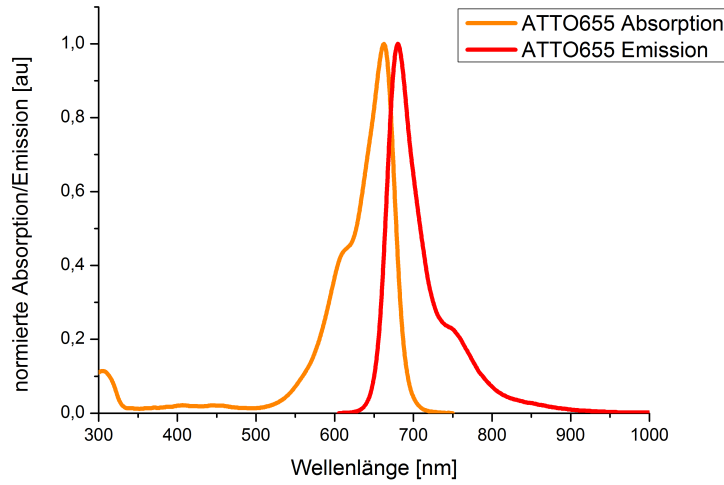


Abbildung 3.9: Fluoreszenzspektrum von *ATTO*[®]655. Die Absorption und Emission sind auf ihr jeweiliges Maximum normiert.

ATTO[®]655 wurde für die Darstellung des HFQ-ähnlichen Proteins, welches an eine DNA-Origami Nanostruktur gekoppelt wurde, genutzt. Ebenso interagierten die mit *ATTO*[®]655 markierten DNA-Stränge mit den *Fiducial Markern* der Firma GATTAQUANT GmbH, siehe 3.1.6.2. Für die Abbildung des Proteins auf dem DNA-Origami ist der farbstoffmarkierte Strang in einer Konzentration von 10 nM in die Probenkammer mit dem Messpuffer aus PBS und 10 mM MgCl₂ gegeben worden.

FRET Als Akzeptor-Farbstoff für die FRET-Messungen wurde der bereits beschriebene Fluorophor *Abberior STAR RED* verwendet. Als Donor diente der Fluoreszenzfarbstoff *ATTO*[®]542. Die jeweils 22 Nukleotide langen Stränge waren ebenfalls am 3'-Ende mit Farbstoffen markiert. Um zu gewährleisten, dass an jedem DNA-Origami sowohl ein grüner als auch ein roter Farbstoff angeregt werden konnte, unterschieden sich die Sequenzen, die im Folgenden gezeigt sind:

5'-GTC ATG TAG GTC GTA GAG GGG-3' *ATTO*[®]542

5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA-3' *Abberior STAR RED*

Der *ATTO*[®]542 besitzt sein Absorptionsmaximum bei 542 nm. Das Fluoreszenzmaximum wird bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen, während der Extinktionskoeffizient ϵ einen Wert von $1,2 \cdot 10^5 \frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ beträgt. Die Fluoreszenzquantenausbeute η beträgt 93 % bei einer Lebensdauer τ von 3,7 ns. Eine effiziente Anregung erfolgt bei Wellenlängen des

Bereichs 520 nm bis 555 nm [172]. Die Spektren der beiden für die FRET-Experimente genutzten Farbstoffe finden sich in folgender Abbildung 3.10

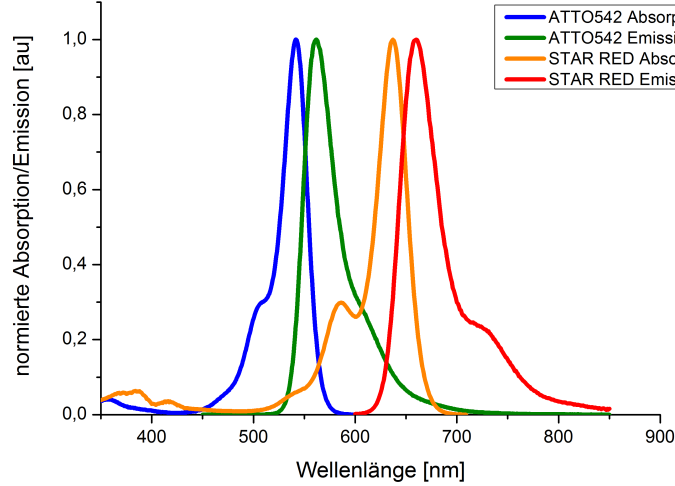


Abbildung 3.10: Fluoreszenzspektren von *ATTO*[®]542 und *STAR RED*. Die Absorption und Emission sind auf ihr jeweiliges Maximum normiert.

Bei einer Wellenlänge von etwa 520 nm beginnt die Überschneidung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Diese besteht bis zu einer Wellenlänge von 709 nm. Für Messung von FRET wurden die farbstoffmarkierten Stränge nach der Herstellung der Nanostruktur in einer Konzentration von 10 nM gegeben und für 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Strukturen mittels Gelelektrophorese von überschüssigen Strängen befreit.

Im Laufe der Arbeit erwies sich der *Abberior STAR RED* als für die FRET-Experimente unkomfortabel zu handhabender Farbstoff, weshalb ein Wechsel des Akzeptormoleküls durchgeführt und der *Abberior STAR RED* durch den *ATTO*[®]647N ersetzt wurde. Das Farbstoffpaar *ATTO*[®]542 und *ATTO*[®]647N wurde bereits häufig in der AG Tinnefeld eingesetzt [50] [173] [174] und hat sich dort als geeignetes Farbstoffpaar erwiesen [175]. Der *ATTO*[®]647N besitzt sein Absorptionsmaximum bei 646 nm. Das Fluoreszenzmaximum wird bei einer Wellenlänge von 644 nm gemessen, während der Extinktionskoeffizient ε einen Wert von $1,5 \cdot 10^5 \frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ beträgt. Die Fluoreszenzquantenausbeute η beträgt 65 % bei einer Lebensdauer τ von 3,5 ns. Eine effiziente Anregung erfolgt bei Wellenlängen des Bereichs 625 nm bis 660 nm [176]. Durch den Einsatz des *ATTO*[®]647N ändert sich für diese Messungen der Försterradius R_0 bedingt durch das geänderte Überlappintegral J sowie den Extinktionskoeffizienten des Akzeptors $\varepsilon_A(\lambda)$. Zur Verdeutlichung sind in folgender Abbildung 3.11 die Absorptions- und Emissionsspektren des neuen FRET-Paares gezeigt.

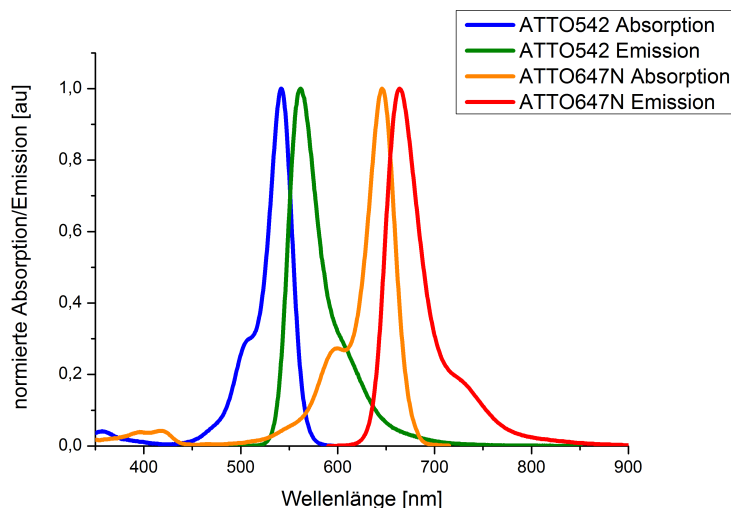


Abbildung 3.11: Fluoreszenzspektren von *ATTO*[®]542 und *ATTO*[®]647N. Die Absorption und Emission sind auf ihr jeweiliges Maximum normiert.

In Abbildung 3.11 sind die Emissions- und Absorptionsspektren des grünen und roten Farbstoffes für die quantitativen FRET-Experimente gezeigt. Auffällig ist die starke Ähnlichkeit des *ATTO*[®]647N Spektrums zu dem des *Abberior STAR RED*. Bis auf eine Verschiebung des *Abberior STAR RED* zu kleineren Wellenlängen in der Absorption und Emission lassen sich keine gravierenden Unterschiede feststellen.

Neben dem Einsatz für die FRET-Experimente ist *ATTO*[®]542 für die Kolokalisierung des immobilisierten Proteins genutzt worden, siehe Kapitel 3.1. Alle Sequenzen finden sich zusätzlich im Anhang A.2.

3.2 Experimenteller Aufbau

3.2.1 Weitfeld-Mikroskop

Im Folgenden wird das Weitfeld-Mikroskop, welches für die DNA-PAINT und FRET Messungen eingesetzt wurde, beschrieben. Es handelt sich dabei um einen speziell entwickelten Aufbau, welcher in selbiger Form bereits in [11] für die Superauflösungsmikroskopie genutzt wurde. In der folgenden Abbildung 3.12 ist der Aufbau des Weitfeld-Mikroskops dargestellt.

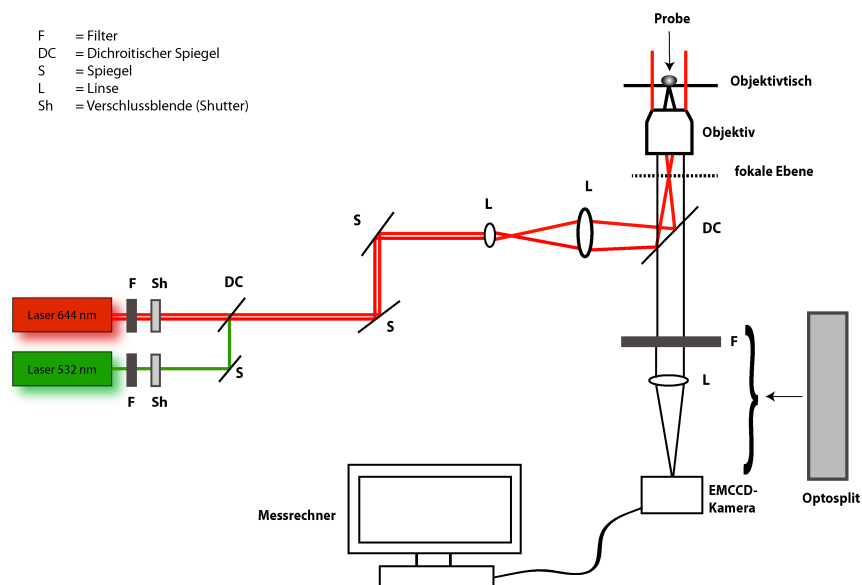


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des in dieser Arbeit genutzten Aufbaus nach [11]. Die Laserstrahlen werden auf die hintere fokale Ebene des Objektivs fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wird mit einer EMCCD-Kamera detektiert und an den Messrechner überführt. Für FRET-Messungen wird ein grüner Laserstrahl in den bestehenden Strahlengang eingekoppelt. Zur Übersicht ist lediglich der Einkopplungsschritt gezeigt. Für die alternierende Laseranregung werden zwei Verschlussblenden eingesetzt. Die Detektion der Fluoreszenz beider Kanäle wird durch einen Optosplit ermöglicht.

Das genutzte TIRF (siehe Kapitel 2.2.2) Mikroskop besteht maßgeblich aus dem Anregungsstrahlengang mit den Laserlichtquellen, dem Mikroskop und dem Detektionsstrahlengang, welcher in Abhängigkeit der Messmethode verändert werden konnte.

Für jede Messmethode wurde der Diodenlaser *ibeam smart* der Firma **Toptica Photonics** eingesetzt. Dieser strahlte Licht der Wellenlänge 644 nm aus und erreichte eine maximale Nennleistung von 150 mW. Das ausgestrahlte Licht wurde zunächst durch einen ReinigungsfILTER *650/13 Brightline HC* der Firma **AHF Analysetechnik** geleitet. Dieser transmittierte selektiv einen Bereich von $650 \text{ nm} \pm 13 \text{ nm}$ und reflektiert alle übrigen Wellenlängen [177]. Der Laserstrahl wurde über eine aus zwei Spiegeln bestehende Photonentreppe in eine aus zwei Linsen bestehende optische Anordnung eingekoppelt. Die erste Linse diente dabei der

Ausleuchtung der zweiten Linse, welche das Laserlicht auf die hintere fokale Ebene des Objektivs fokussiert. Somit traf das Laserlicht in einem größtmöglichen Öffnungswinkel auf das Objektiv. Dies erhöhte zwar die Homogenität und Größe der ausgeleuchteten Fläche, verringerte jedoch die im Objektiv ankommende Intensität des Laserlichts. Zudem waren die Linsen auf einer speziellen *Mikrobank* angeordnet, die eine Verschiebung in x-Richtung ermöglichte. Diese Konstruktion erlaubte die dezentrale Einkopplung des Laserlichts in das Objektiv und schuf durch die so mögliche Winkeländerung zwischen Laserlicht und Probenkammer die Grundlage zur *Objective-TIRF*-Anregung [178], siehe Kapitel 2.2.1.

Der Olympus Mikroskopkörper *Olympus-IX-71* befand sich auf einem speziellen Stabilisierungstisch (*TS 300*) der Firma **Table Stable**, wodurch Schwingungen und Erschütterungen gedämpft wurden. Das Immersionsölobjektiv *Olympus UPlanSApo N 100x*, $NA = 1,40$ war mit dem Revolverprobentisch *Olympus IX2 NPS* verbunden, wodurch eine Entkopplung der beweglichen Komponenten zwischen Probe und Objektiv ermöglicht wurde. Diese Erweiterung förderte zusätzlich die Driftstabilität in jede der drei Raumrichtungen.

Im Mikroskopkörper ist das Laserlicht zunächst durch einen Laser-Strahlenteiler *zt532/647 rpc* von **AHF Analysetechnik** in das Immersionsölobjektiv geleitet worden. Der Strahlenteiler reflektierte Anregungslicht im Bereich von 500 nm bis 647 nm und erlaubte die Transmission für Licht ab einer Wellenlänge von 663 nm [179]. Da das Anregungslicht teilweise transmittiert wurde, war ein weiterer Filter in den Detektionsstrahlengang integriert worden. Für die Fluoreszenz des roten Laserlichts ist der Filter *ET 700/75* von **AHF Analysetechnik** verwendet worden. Das gefilterte Fluoreszenzlicht wurde durch eine weitere Linse auf die EMCCD Kamera *Andor iXon X3* fokussiert. Deren Detektionseffizienz konnte durch einen Verstärkungsfaktor, den sogenannten *EM Gain* erhöht werden. Dabei erfolgte die Vervielfachung von Ladung, bevor diese den eigentlichen Auslesechip der Kamera erreichte. Dies führt zu einem effektiv verbessertem Signal-Rausch-Verhältnis [104] [180]. Letztlich wurden die durch die EMCCD Kamera aufgenommen Bilder an den Messrechner überführt.

Für die DNA-PAINT-Messungen diverser Abstände auf dem NRO wurde lediglich der rote Laser eingesetzt. Die supraaufgelöste Darstellung des Proteins erfolgte ebenfalls mittels roter Laseranregung. Im Anschluss dieser Messung wurde ein beugungsbegrenztes Bild im grünen Kanal aufgenommen, wodurch die mit *ATTO[®]542* markierten DNA-Origami Nanostrukturen identifiziert wurden. Um die Fluoreszenz des grünen Farbstoffs zu detektieren, erfolgte ein Tausch der Filter im Detektionsstrahlengang. Der Filter *BrightLine 582/75* der Firma **AHF Analysetechnik** ist vor der Aufnahme des beugungsbegrenzten Bildes entsprechend eingesetzt worden. Zur Anregung wurde ein grüner Faserlaser benutzt, dessen Eigenschaften im Folgenden beschrieben werden.

Für die zweifarbiges FRET-Messungen wurde ein grüner Faserlaser von MPBCommunications mittels eines Spiegels in den Strahlengang eingekoppelt. Der grüne Laser strahlte Licht der Wellenlänge 532 nm aus und erreichte eine maximale Nennleistung von 1 W. Der Strahl wurde zunächst durch einen clean-up filter (Chroma, Z532/647x) geleitet. Um die Fluoreszenz der beiden Detektionsstrahlengänge erfassen zu können, ist ein *Optosplit* (cairn-research, *Optosplit II*) vor der EMCCD Kamera in den Aufbau integriert worden. Dieser teilte mit weiteren dichroitischen Strahlenteilern die jeweils emittierte Fluoreszenz, welche auf separaten Kanälen der Kamera abgebildet wurde. Um die FRET-Experimente mit ALEX durchzuführen, sind zwei Verschlussblenden (*Shutter*, Uniblitz Electronics, *LS6T2-NL*) nach den clean-up-Filtern in den Strahlengang integriert worden. Diese sind motorgesteuert und werden in Kapitel 3.2.1.3 genauer beschrieben.

3.2.1.1 Durchführung von DNA-PAINT-Messungen

Das nach Kapitel 3.1.6 und 3.1.6.3 vorbereitete *NuncTM LabTekTM* wurde zunächst mit Ethanol an der Unterseite gereinigt, um vorhandene Verschmutzungen zu entfernen. Anschließend wird ein Tropfen Immersionsöl (Olympus, *IMMOIL-F30CC*) auf das Objektiv gegeben. Durch das Immersionsöl wurde die Lichtbrechung reduziert, was wiederum zu einer höheren Signalstärke führte. Auf dieses ist die zu untersuchende Kammer des *NuncTM LabTeksTM* gestellt worden. Die Kamera und Bildaufnahme wurde mittels *Image J* gesteuert. Die Leistung der Laseranregung (644 nm) betrug ~ 50 mW für die Ermittlung geeigneter Regionen auf der Oberfläche und die Fokussierung. Geeignete Regionen zeichnen sich durch eine homogene Verteilung von Bildpunkten sowie eine unbeschädigte Oberfläche aus. Sobald die Bildpunkte erkennbar im Fokus verweilten, wurde die Leistung für die tatsächliche Messung auf 150 mW erhöht. Für DNA-PAINT Messungen des NRO mit *docking strands* in bestimmten Abständen wurden 12.000 Bilder, sogenannte *Frames*, aufgenommen, wobei die Integrationszeit jeweils 300 ms betrug. Hieraus ergibt sich eine Messzeit von 60 Minuten. Die einzelnen Frames wurden auf dem Messrechner hinterlegt und im Anschluss für die Erstellung eines superaufgelösten Bilds analysiert. Um eine entsprechende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden sieben bis acht Messungen an mindestens drei Messtagen durchgeführt.

Für die superaufgelöste Darstellung der DNA-Origami-Protein Nanostruktur wurden 63.000 *Frames* aufgenommen, wobei die Integrationszeit jeweils 200 ms betrug. Aus diesen Werten resultierte eine Gesamtmesszeit von 210 Minuten. Im Anschluss an die Superauflösungsmessung wurde ein beugungsbegrenztes Bild im grünen Kanal aufgenommen. Dazu ist der entsprechende Laser (Wellenlänge 532 nm) mit einer Leistung von 200 mW zu geschaltet worden. Es wurde ein Frame mit einer Integrationszeit von 800 ms aufgenommen. In

der *LabVIEW*-basierten Auswertungssoftware war dieses mit dem superaufgelöste Bild übereinander gelegt worden, um die Koloalisation von Protein und NRO zu prüfen und die spezifische Analyse der gebundenen Proteine sicher zu stellen. Um eine entsprechende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden sieben bis acht Messungen an mindestens drei Messtagen durchgeführt. Die einzelnen Frames wurden auf dem Messrechner hinterlegt und im Anschluss für die Erstellung eines superaufgelösten Bilds analysiert.

3.2.1.2 Auswertung der DNA-PAINT-Daten

NRO mit docking strands Zur Generierung eines superaufgelösten Gesamtbildes wurde zunächst ein mit der Software *Matlab* geschriebener Algorithmus verwendet. Die Software¹ markierte pro Frame für jede fluoreszierende Punktlichtquelle, die einen gewissen Schwellwert überschritt, deren Zentrum. Dazu wurde die mittlere Signalstärke des Pixels und dessen unmittelbare Umgebung mit der mittleren Signalstärke der ferner liegenden Umgebung verglichen. War die Intensität der betrachteten Pixelanhäufung um den Faktor 1,4 größer als die Intensität der umliegenden Pixel, wurden diese markiert. Eine zusammenhängende Menge an Pixeln in einem Bereich von $8 \cdot 8$ Pixeln, deren Zentrum durch eine Gaußfunktion bestimmt wurde, wird als *Lokalisation* oder *Spot* bezeichnet. In einer binären Datei wurden die Informationen der entsprechenden Ansammlung von Koordinatenpunkten hinterlegt [49] [104]. Die erhaltenen Koordinaten sind anschließend mit einer *LabVIEW*-basierten Auswertungssoftware² analysiert worden. Die Koordinatenpunkte wurden zunächst als farbcodierte Pixel dargestellt. Mit zunehmender Häufigkeit der Lokalisation in dem jeweiligen $8 \cdot 8$ Pixel großen Bereich stieg deren Helligkeit. Dieses farbcodierte 2D-Histogramm wurde in einem Datenfeld abgebildet, dessen Auflösung höher war als die der verwendeten EMCCD-Kamera ($100 \cdot 100$ nm-Pixel) [181]. Die Kantenlängen der Pixel im Gesamtbild waren 10-mal kürzer als die Kantenlängen der Kamera-Pixel. Dieses Pixel-Binning konnte für die Betrachtung der einzelnen Spots während der manuellen Datenanalyse variiert werden, um die Auflösung einzelner Spots zu verbessern. Um die einzelnen Spots zu betrachten, mussten diese von der *LabVIEW* Software erkannt werden. Eine Anhäufung von Pixeln wurde als *An-Zustand* gewertet, wenn ein gewisser Intensitätsschwellwert überschritten wurde. Dazu ist erneut die mittlere Signalstärke des Pixels und dessen unmittelbare Umgebung mit der mittleren Signalstärke der ferner liegenden Umgebung verglichen worden. War die Intensität der betrachteten Pixelanhäufung um den Faktor 1,4 größer als die Intensität der umliegenden Pixel, wurde diese in einem bestimmten Bereich (Radius von 30 nm) markiert. Diese Spots sind mit Hilfe einer Gaußverteilung angenähert worden und wiesen ein Maximum an der Stelle auf, an der sich der *docking strand* befand, siehe Kapitel 2.2.2. Um den Abstand zwi-

¹Die *Matlab* Software wurde von Dr. Jürgen Schmied zur Verfügung gestellt

²Die *LabVIEW* Software wurde von Dr. Mario Raab zur Verfügung gestellt

schen zwei im Auswahlbereich befindlicher Spots zu ermitteln, wurden die Bilder der Spots in die Horizontale überführt. So verläuft die Verbindungslinie genau auf der x-Koordinate, was die systematische Vermessung zu kurzer Abstände verhindert. Anschließend wurden die bildgebenden Pixel spaltenweise aufsummiert. Daraus resultierte ein Querschnittshistogramm der Lokalisationssummen, das mit einer doppelten Gaußverteilung angenähert wurde. Für einen Doppelspot ergaben sich dabei zwei Maxima. Aus deren Differenz wurde der Abstand zwischen den beiden Spots bestimmt. Die zur Abstandsbestimmung genutzte Doppelgaußfunktion ist in Gleichung 3.1 gezeigt:

$$y = A \cdot \exp\left(-\frac{(x_1 - x_0)^2}{2\sigma_1^2}\right) + B \cdot \exp\left(-\frac{(x_2 - x_0)^2}{2\sigma_2^2}\right) \quad (3.1)$$

Abbildung 3.13 stellt die eben beschriebene analytische Datenverarbeitung dar.

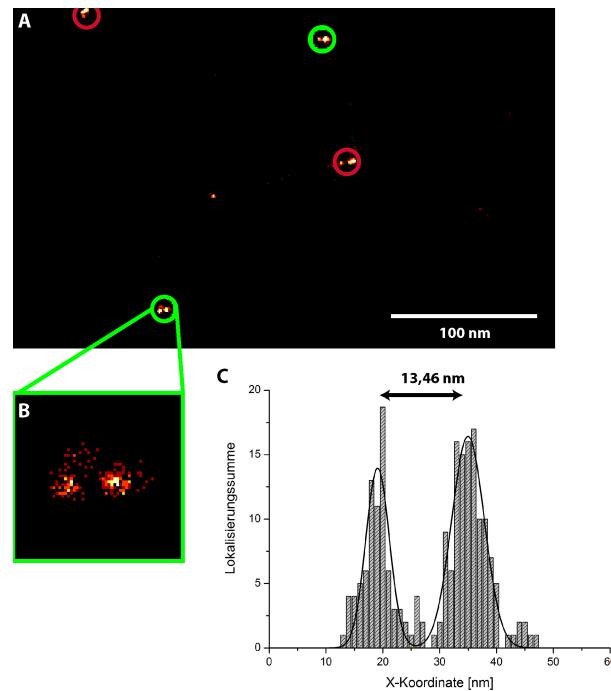


Abbildung 3.13: DNA-PAINT Datenauswertung. A: Ausschnitt des in *LabVIEW* erstellten Gesamtbildes. Diverse Doppelspots (Pixelbinning: 3 nm pro Pixel) werden auf Basis des in *LabView* hinterlegten Algorithmus gefunden und ausgewertet. Rot und grün umkreiste Spots sind als solche erkannt und durch die Rahmenbedingungen des Algorithmus unterschiedlich bewertet worden. B: Beispielhafte Vergrößerung (50 · 50 Pixel, Pixelbinning: 1 nm pro Pixel) eines vom Algorithmus korrekt bewerteten Doppelspots. Deutlich sind zwei Anhäufungen von farbencodierten Pixeln zu erkennen. C: Die Lokalisationssummen der Doppelspots werden in einem Querschnittshistogramm entlang der x-Koordinate aufgetragen. Durch eine Doppelgaußfunktion werden die zwei erhaltenen Maxima angenähert, aus deren Differenz sich die Distanz der Spots zueinander ergibt.

Da pro supraaufgelöstem Bild eine Vielzahl an Nanostrukturen analysiert wurden, sind alle erhaltenen Abstände gezählt und entsprechend ihrer Häufigkeit in einem Histogramm dargestellt worden. Diese Häufigkeiten wurden abschließend durch eine Normalverteilung angepasst, wodurch ein mittlerer Gesamtabstand für die in einer Messung untersuchten Nanostrukturen resultierte. Der verwendete Algorithmus erstellte automatisch aus den diversen gefundenen Abständen eine vorläufige Statistik. Dabei wurden gefundene Abstände gewertet, die mit der Funktion nach Gleichung 3.1 angepasst werden konnten. Diese sind in Abbildung 3.13 durch grüne Markierungen dargestellt. Wurde ein realer Doppelspot vom Algorithmus nicht erkannt oder falsch vermessen, erschien dieser mit einer roten Markierung im Datenfeld. Diese gehen aufgrund falscher Abstandsbestimmungen, zu geringer Lokalisationen und damit verbundenen An- und Auszeiten nicht in die automatisch erstellte Statistik ein. Grün markierte Spots hingegen erfüllen dieses Kriterien. Lag der Doppelspot beispielsweise nicht in horizontaler Position, wodurch der Abstand falsch bestimmt wurde, konnte dies durch die Rotation des Bildwinkels geändert werden. So konnten entsprechende Spots in die Horizontale überführt und manuell vermessen werden. Mittels *LabVIEW* wurde das Querschnittshistogramm der Lokalisierungen dieses Doppelspots abgebildet. Durch drei Positionsmarken ließen sich die zwei Maxima der Häufigkeitsverteilung einrahmen und durch eine doppelte Gauß-Verteilung annähern. Aus den Differenzen der Maxima wurde der Abstand bestimmt. Diese Abstände wurden gesondert vermerkt und mit den Abständen des Algorithmus durch eine Häufigkeitszählung aller Werte final ausgewertet [11].

Zusätzlich beinhaltete die automatisch erstellte Statistik auch wesentlich vom Design abweichende Abstände. Bei solchen Strukturen handelte es sich um Artefakte wie beispielsweise nicht korrekt gefaltete DNA-Origami Nanostrukturen, Defekte auf der Oberfläche oder zwei verschiedene beieinander liegende Strukturen, an die die *Imager*-Stränge hybridisieren [71]. Solche Artefakte ließen sich durch verschiedene Faktoren eindeutig identifizieren. Die An- und Abbindekinetiken waren ein erster Anhaltspunkt. Für ein DNA-Origami mit funktionstüchtigen *docking strands* zeigte sich ein kontinuierliches An- und Abbinden der Imager-Stränge über den Großteil der Messdauer. Handelte es sich hingegen um ein Artefakt, zeigen sich nur vereinzelt An- und Abbindeevents. Auch die Anzahl an Lokalisationen half, ein DNA-Origami von einer unspezifischen Darstellung zu unterscheiden. Im Falle der Superauflösungsmikroskopie wurden mindestens 120 Lokalisationen, was einem Schnitt von 60 Lokalisationen pro Anbindestelle entspricht, erwartet, um von einem abgebildeten DNA-Origami ausgehen zu können. Artefakte konnten manuell aus der Statistik entfernt werden.

HFQ Superauflösung Die Gesamtheit der automatisierten Auswertung, wie in 3.2.1.2 beschrieben, ist für die supraaufgelöste Darstellung des HFQ-Proteins auf der DNA-Origami Nanostruktur nicht anwendbar. Da bei einem im Idealfall vollständig mit DNA-Strängen markierten Protein mehr als zwei Spots vorhanden sind, konnte der verwendete Algorithmus

hierbei kein korrektes Ergebnis liefern. Im Falle von Dreifachspots beeinflussten sich die Lokalisationssummen der jeweiligen Spots. Standen drei Punkte beispielsweise im rechten Winkel zu einander, wurde einer der horizontal liegenden Spots durch den darüber befindlichen in dessen ursprünglichem Spaltenhistogramm der Lokalisationssummen beeinflusst. Dadurch wurde der horizontale Abstand ungenau vermessen. Um dies zu verhindern, wurden mit einem Markierungsradius von 50 nm zunächst die mit der DNA-Origami Nanostruktur kolokalisierten Strukturen ausgewählt. Diese wurden exportiert und mit Hilfe einer weiteren *LabVIEW* Software³ gesondert analysiert. Mit dieser war es möglich Dreifachspots als zwei Doppelspots zu betrachten. Durch diese Separierung wurde die Überlagerung der Lokalisationssummen zweier übereinander liegender Punkte verhindert. Die Abstände zwischen den Spots wurden ebenfalls aus den Differenzen der Maxima eines doppelten Gaußfits bestimmt, gesondert vermerkt und mit Hilfe einer Häufigkeitszählung aller Werte final ausgewertet.

3.2.1.3 Durchführung von FRET-Experimenten

Um die Proben mittels FRET am für die Superauflösungsmikroskopie genutzten Setup zu analysieren, wurde der Optosplit (Kapitel 3.2.1) an entsprechender Stelle in den Detektionsstrahlengang gekoppelt (siehe Abbildung 3.12). Dieser ermöglichte die separate Detektion der jeweils emittierten Fluoreszenz und bildete sie auf separaten Regionen der Kamera ab. Für die FRET-Messungen mit alternierender Laseranregung wurden nach den Emissionsfiltern des grünen und roten Lasers zwei Verschlussblenden (Shutter) gesetzt. In diesem Aufbau waren die Verschlussblenden motorgesteuert, deren Alternierung bei einer Bildfrequenz von 10 Hz mit einer *LabVIEW* basierten Software⁴ für die jeweiligen Laserzeiten erfolgte. Alternierende Spektroskopie liefert zusätzliche Informationen über die Anwesenheit und den photophysikalischen Zustand des Donors sowie des Akzeptors. Einzelne Farbstoffmarkierungen können von zweifachmarkierten Komplexen unterschieden werden [182]. Für die Analyse wurden ausschließlich DNA-Origami Nanostrukturen verwenden, die sowohl über den Donor als auch den Akzeptor verfügen.

Das nach Kapitel 3.1.6 und 3.1.6.3 zur Messung von immobilisierten Nanostrukturen vorbereitete *NuncTM LabTeksTM* wurde zunächst mit Ethanol an der Unterseite gereinigt, um vorhandene Verschmutzungen zu entfernen. Anschließend wurde ein Tropfen Immersionsöl (Olympus, *IMMOIL-F30CC*) auf das Objektiv gegeben. Auf dieses ist die zu untersuchende Kammer des *NuncTM LabTeksTM* gestellt worden. Die Kamera und Bildaufnahme wurde mittels *Andor* Software gesteuert. Diese bildete die mit der EMCCD-Kamera (*Andor IXon X3*, pre-Gain 5.1, Gain 250, Bildfrequenz 10 Hz) aufgenommen Bilder auf separate Kanäle ab. Die Leistung der Laseranregung (644 nm) betrug zunächst ~ 20 mW für die Ermittlung

³Die *LabVIEW* Software wurde ebenfalls von Dr. Mario Raab zur Verfügung gestellt

⁴Die *LabVIEW* Software wurde von Dr. Ija Jusuk zur Verfügung gestellt

geeigneter Regionen auf der Oberfläche und die Fokussierung. Geeignete Regionen zeichnen sich durch eine homogene Verteilung von Bildpunkten sowie eine unbeschädigte Oberfläche aus. Bei FRET-Messungen ist es anders als bei der Superauflösung ausschlaggebend, dass die Oberfläche über eine geringe Anzahl an Bildpunkten pro Kanal verfügt. Nur so konnten die Bilder der beiden Region im Anschluss adäquat übereinander gelegt werden. Sobald die Bildpunkte stabil im Fokus verweilten, wurde die Leistung des roten Lasers für die tatsächliche Messung auf 100 – 150 mW erhöht. Die Leistung des grünen Lasers betrug für die Messreihen 300 mW. Um eine entsprechende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden durchschnittlich 40 bis 70 Messungen von 500 - 1000 Frames (Integrationszeit 100 ms) pro Messtag durchgeführt.

3.2.1.4 Auswertung der FRET-Daten

Die hinterlegten Videos des Weitfeldmikroskops sind mit einer *LabVIEW*-basierten Auswertungssoftware⁵ zur weiteren Analyse geöffnet worden. Dabei wurden der Donor- und Akzeptorkanal als Mittel der ersten 50 Frames jeweils bildlich wiedergegeben. Die Bildpunkte der Kanäle wurden mittels Verschiebung und Verzerrung in zwei Raumrichtungen überlagert. Ein dem Kapitel 3.2.1.2 nachempfunder Algorithmus markierte automatisch die Moleküle, die jeweils einen roten und einen grünen Farbstoff trugen, sofern diese einen Intensitätsschwellwert von 1,4 überschritten. Die Darstellung beider Kanäle, deren Überlagerung und die automatisierte Spotauswahl ist in Abbildung 3.14 veranschaulicht.

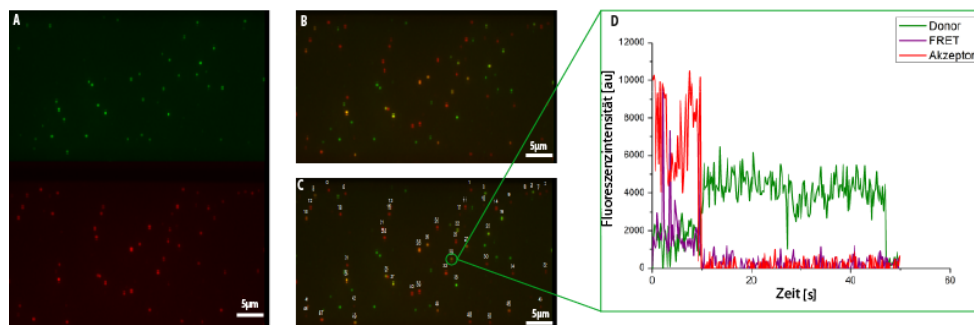


Abbildung 3.14: Darstellung der Detektionskanäle. Getrennte Detektionskanäle (A), deren Überlagerung (B) sowie die automatisierte Spotauswahl (C) und eine resultierende FRET-Spur (D).

Anschließend sind für die markierten Moleküle zeitlich aufgelöste Intensitätsspuren generiert worden, siehe Abbildung 3.14 D. Die Farbgebung der drei auf diese Weise erhaltenen Spuren ist wie folgt gegliedert: Der Akzeptor wurde in rot dargestellt, er ist durch den roten Laser angeregt und im roten Kanal detektiert worden (rote Anregung/rote Detektion). Der Donor wurde mittels grünem Laserlicht zur spontanen Emission im grünen Farbkanal veranlasst

⁵Die Software wurde von Dr. Andreas Gietl und Dr. Carsten Forthmann zur Verfügung gestellt

(grüne Anregung/grüne Detektion). Die letzte Spur beschrieb die Intensität des FRET, hier in violett illustriert. Bei FRET erfolgte die Anregung der Moleküle durch den grünen Laser, die Emission wurde allerdings im roten Kanal detektiert (grüne Anregung/rote Detektion). Aus diesen sind lediglich Spuren gewählt worden, bei denen sich ein Antikorrelationsverhalten zeigte. Beim *Akzeptorbleichen* stoppt die Fluoreszenzemission des roten Farbstoffs. Infolgedessen kann der Donor seine Energie nicht weiter an den Akzeptor übertragen, seine eigene Emissionsintensität steigt. Dem liegt zu Grunde, dass die Absorptionsspektren nicht mehr überlappen, was in der fehlenden Fluoreszenz des Akzeptors resultiert. Zeitgleich fällt die Intensität der FRET-Spur ab.

Für die Berechnung der Distanzen in Korrelation mit dem entsprechenden Energieübertrag reicht Gleichung 2.8 nicht aus. Korrekturfaktoren sind zusätzlich zu berücksichtigen. Die ausgewählten Spuren wurden hinsichtlich ihres Hintergrundes, der direkten Anregung des Akzeptors (*direct excitation* α) durch den grünen Laser, der Detektion der Donorfluoreszenz im Akzeptorkanal (*crosstalk*, β) (siehe Kapitel 2.2.3) und des Gammafaktors γ korrigiert. Unter Einbeziehung der Korrekturfaktoren erweitert sich Gleichung 2.11 zur Berechnung der FRET-Effizienz:

$$E_{korrigiert} = \frac{I_A - \beta I_D - \alpha I_A^{direkt}}{I_A - \beta I_D - \alpha I_A^{direkt} + \gamma I_D} \quad (3.2)$$

In Formel 3.2 beschreiben I_A und I_D jeweils die Intensität des Akzeptors und des Donors. I_A^{direkt} beschreibt die Intensität des Akzeptors, wenn dieser direkt angeregt wird [145]. Die jeweiligen Korrekturfaktoren werden durch folgende Gleichungen repräsentiert:

$$\alpha = \frac{I_A''}{I_A^{direkt}} \quad (3.3)$$

$$\beta = \frac{I_A'}{I_D'} \quad (3.4)$$

$$\gamma = \frac{I_A - I_A'}{I_D' - I_D} \quad (3.5)$$

Die Korrektur der *direct excitation* wurde bei Spuren vorgenommen, bei denen der grüne Donor weit vor dem roten Akzeptor bleicht. Der *cross talk* lässt sich zusammen mit dem γ -Wert an gängigen FRET-Spuren bestimmen, in denen der rote Akzeptor vor dem grünen Donor seine Intensität verliert. Die Hochkommata bezeichnen jeweils die Intensitäten der entsprechenden Moleküle nachdem der Donor (I_A'') oder der Akzeptor (I_A') geblichen ist [145].

3.2.2 konfokales Mikroskop

Um die Aussagekraft der E-Werte zu bestätigen, sind die Untersuchungen der immobilisierten DNA-Origami Nanostrukturen an einem für FRET-Experimente ausgelegtem Mikroskop der AG Tinnefeld wiederholt worden. Die quantitative Auswertung der FRET-Effizienzen erfolgte durch die Vermessung der DNA-Origami Nanostrukturen in Lösung mit dem bereits etablierten FRET-Paar *ATTO*[®]542 und *ATTO*[®]647N. Bei dem verwendeten Aufbau handelte es sich um ein selbst entwickeltes konfokales Mikroskop. Für eine exakte Beschreibung des Aufbaus sei auf [183] verwiesen. Eine schematische Darstellung ist in folgender Abbildung 3.15 gezeigt.

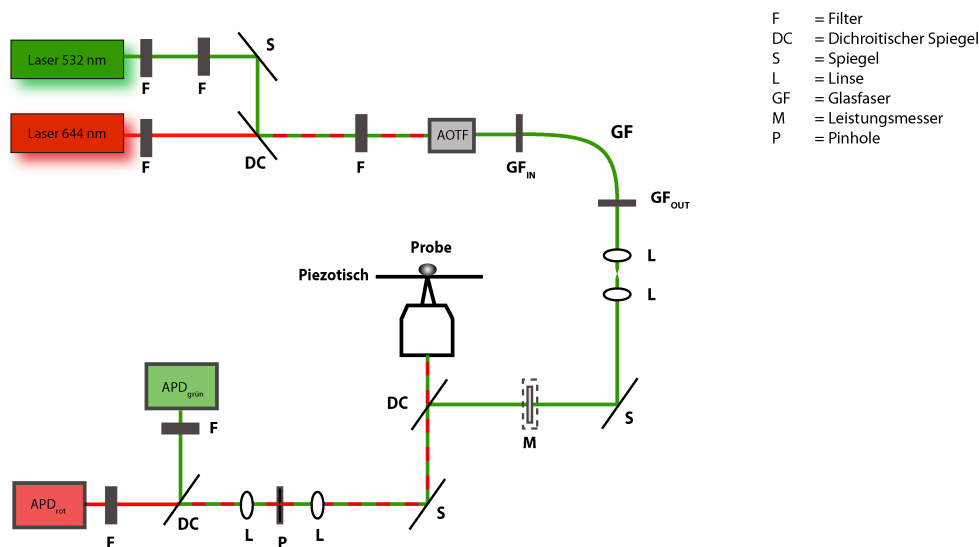


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung des in dieser Arbeit genutzten konfokalen Aufbaus. Die Laserstrahlen werden über den **A**cousto-**O**ptical **T**unable **F**ilter (AOTF) und eine Glasfaser auf die Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wird durch ein Pinhole zu den Detektoren (Lawinenphotodioden) geleitet und an den Messrechner überführt.

Die in Abbildung 3.15 eingesetzten Laser zur Anregung der Probe passieren zunächst jeweils entsprechende Reinigungsfilter und werden anschließend durch einen Dichroitischen Spiegel zusammengeführt. Das hier genutzte konfokale Mikroskop für die Reproduktion der am Weitfeld bestimmten FRET-Werte verfügte über zwei Anregungslaser. Ein *Sapphire LP 532nm* der Firma **Coherent** mit einer maximalen Leistung von 100 mW wurde für die Anregung des Donors und ein *LDH-D-C-640* der Firma **Picoquant** für die Anregung des Akzeptors verwendet. Mit dem akustooptischen Modulator (AOTF) *AOTFnc-VIS* von **AA optoelectronic** konnte die Intensität des Laseranregungslichts sehr schnell geschaltet werden, wodurch alternierende Laseranregung (ALEX) entstand [184]. Durch die dem AOTF nachgeschaltete Faser konnte die Höhendifferenz bis zum Mikroskop überwunden werden. Die entsprechende Leistung des jeweiligen Lasers konnte durch einen Leistungsmessers

überprüft und eingestellt werden. Mit Hilfe des Objektivs wurden die Laserstrahlen auf die Probe fokussiert [185]. Diese befand sich auf einem beweglichen Objektisch (Piezo Stage), sodass die Probe automatisch abgerastert wurde. Eine Lochblende (Pinhole) verhinderte die Detektion von Fluoreszenz, die nicht aus der fokussierten Region stammt. Nur Licht aus dem fokussierten Anregungsbereich konnte die Lochblende vollständig passieren [186]. Die einzelnen Messungen wurden auf dem jeweiligen Messrechner hinterlegt und im Anschluss analysiert.

3.2.2.1 Durchführung von FRET-Experimenten am konfokalen Aufbau

Um die Proben mittels FRET am konfokalen Aufbau zu analysieren, ist bei der Vorbereitung wie in Kapitel 3.2.1.3 vorzugehen. Die Probenkammer ist auf den Piezotisch gestellt und fokussiert worden. Die Bildaufnahme und Alternierung wurde mittels *LabVIEW* Software⁶ gesteuert. Zunächst ist ein definierter Bereich von $10 \times 10 \mu\text{m}$ mit dem grünen Laser (Leistung $\sim 3 \mu\text{W}$) beleuchtet worden. Die dort abgebildeten Bildpunkte werden anschließend für die Analyse manuell markiert. Dabei wurden ausschließlich DNA-Origami Nanostrukturen ausgewählt, die sowohl über den Donor als auch den Akzeptor verfügten und als gelbliche Punkte erschienen. Jeder der ausgewählten Bildpunkte wird nachfolgend mit beiden Lasern bei einer Alternierung von 2 ms angeregt. Alternierende Spektroskopie liefert zusätzliche Informationen über die Anwesenheit und den photophysikalischen Zustand des Donors sowie des Akzeptors [182]. Die Leistungen der Laser lagen bei jeweils $\sim 3 \mu\text{W}$. Die in der Software abgebildeten Intensitätsspuren wurden bis zum Bleichen des Donors aufgenommen. Um eine entsprechende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden 20 bis 30 Ausschnitte an mindestens drei Messtagen aufgenommen.

Für die Messung in Lösung wird die Oberfläche der *Nunc™ LabTeks™* Kammer mit BSA abgesättigt, um ein Binden der DNA-Origami Nanostrukturen zu verhindern. Die Nanostrukturen diffundieren durch den Fokus des Laserstrahls, wobei auf eine Verdünnung der Probe (pikomolar) zu achten ist, um einzelne Moleküle im Anregungsfokus zu analysieren. Auch hier konnten durch die alternierende Laseranregung mehrere Detektionskanäle unterschieden werden. Die Leistungen der Laser sind so zu wählen, dass der sogenannte Stöchiometriefaktor S bei einem Wert von 0,5 liegt. Da die Nanostrukturen bei dieser Durchführung nicht auf der Oberfläche liegen, ist der Fokus entsprechend von der Oberfläche zu lösen. Sofern diese Parameter getroffen sind, kann die Messung über die *LabVIEW*-Software⁶ gestartet werden. Eine manuelle Auswahl an Bildpunkten erfolgt hier logischerweise nicht. Die gesammelten Daten werden auf dem Messrechner hinterlegt. Vermessen wurden neben den Abstandsproben als zusätzliche Referenzen drei Sonderanfertigungen der Firma GATTAQUANT

⁶Die *LabVIEW* Software wurde von Dr. Phil Holzmeister zur Verfügung gestellt

GmbH zur γ -Korrektur sowie jeweils eine Nanostruktur zur Korrektur von *direct excitation* und *crosstalk*, die lediglich den Donor oder Akzeptor trägt. Weitere Angaben zu diesem Vorgehen finden sich im folgenden Kapitel. Die Lösungsmessung zeichnet sich besonders dadurch aus, dass vergleichsweise zügig eine große Datenmenge generiert werden kann.

3.2.2.2 Auswertung der konfokalen FRET-Daten

Für die Auswertung der Messdaten von immobilisierten Nanostrukturen des konfokalen Mikroskops ist ebenfalls eine *LabVIEW* Software verwendet worden. Die FRET-Spuren ergeben sich hier aus der Anzahl der Photonen, die für den Donor, Akzeptor und den FRET-Kanal jeweils gegen die Zeit aufgetragen werden. Aus den Differenzen der jeweiligen Photonenzahl ergibt sich der FRET-Wert. Sie ist vergleichbar mit der Auswertung am Weitfeld-Aufbau, siehe Kapitel 3.2.1.4.

Des Weiteren erfolgte die Untersuchung der Nanostrukturen in Lösung. Neben den bereits am Weitfeldaufbau untersuchten Strukturen mit dem *Abberior STAR RED* als Akzeptorfarbstoff wurden die Lösungsmessungen zusätzlich mit einem intern im DNA-Origami angebrachten, etablierten FRET-Paar durchgeführt. Die FRET-Effizienz entspricht dabei der in Kapitel 2.2.3 genannten Gleichung 2.11. Zur Veranschaulichung soll sie hier erneut aufgeführt werden.

$$E = \frac{I_{DA}}{I_{DA} + I_{DD}} \quad (3.6)$$

Neben der FRET-Effizienz ist der sogenannte *Stöchiometriefaktor* S zu berücksichtigen. Dieser gibt das vorliegende Verhältnis zwischen Donor und Akzeptor wieder, siehe Gleichung 3.7.

$$S = \frac{I_{DA} + I_{DD}}{I_{DA} + I_{DD} + I_{AA}} \quad (3.7)$$

mit

I_{DA} = Akzeptor-Emission bei Donor-Anregung

I_{DD} = Donor-Emission bei Donor-Anregung

I_{AA} = Akzeptor-Emission bei Akzeptor-Anregung

Für $S=0$ beziehungsweise $S=1$ liegt jeweils nur der Donor beziehungsweise nur der Akzeptor vor. Ein ausgeglichenes Verhältnis beider Moleküle ist bei $S=0,5$ gegeben. Vor der Durchführung der Messung ist der Stöchiometriefaktor S mittels unterschiedlicher Anregungsleistungen beider Laser auf 0,5 einzustellen. So wird es möglich, unterschiedliche Populationen beider Farbstoffe auszuwerten [187] und die Photonenzahl des jeweiligen

Farbstoffes anzugleichen. Die im Folgenden beschriebene Auswertung der Messung in Lösung orientiert sich maßgeblich an [157] und [188]. Die Datenauswertung setzt zunächst die Definition eines sogenannten *Brust* voraus. Diese Photonenerhöhung während der Diffusion durch den Laserfokus wird in einem bestimmten Zeitfenster erfasst, wenn eine Mindestanzahl an aufeinanderfolgenden Photonen auch mindestens eine bestimmte Anzahl an Nachbarphotonen aufweist. Charakteristische Werte sind eine Millisekunde und 50 aufeinanderfolgende mit 30 benachbarten Photonen. Aufgrund der pikomolaren Konzentration der Probe diffundiert nicht ununterbrochen ein Molekül durch den Fokus. Bedingt durch die hohen eingesetzten Laserleistungen wird auch in diesen Fällen eine Photonenerhöhung detektiert. Dieser Hintergrund (Puffer ohne Probe) wird gesondert aufgenommen. Anschließend wird der jeweilige Kanal der vermessenen Probe um die mittlere Intensität des jeweiligen Hintergrunds korrigiert, beispielhaft gezeigt in Gleichung 3.8.

$$I_{DD}^{Hintergrund} = I_{DD} - Hintergrund_{DD} \quad (3.8)$$

Wie bereits in 3.2.1.4 erläutert, erfolgt auch hier die Korrektur von *direct excitation* (*de*) und *crosstalk* (*ct*). Dabei wird der Quotient aus den detektierten Photonen des Akzeptor-Kanals bei Donor-Anregung und den detektierten Photonen des Akzeptor- beziehungsweise Donor-Kanals bei jeweiliger Anregung gebildet, siehe folgende Gleichung 3.9 und 3.10.

$$de_{Lösung} = \frac{I_{DA}^{Hintergrund}}{I_{AA}^{Hintergrund}} \quad (3.9)$$

und

$$ct_{Lösung} = \frac{I_{DA}^{Hintergrund}}{I_{DD}^{Hintergrund}} \quad (3.10)$$

Sowohl die *direct excitation* als auch der *crosstalk* werden fälschlicherweise als Akzeptor-Emission bei Donor-Anregung detektiert, weshalb diese ebenfalls entsprechend korrigiert werden muss, um die reale Emission des Akzeptors bedingt durch FRET zu erhalten, siehe Gleichung 3.11.

$$I_{FRET} = I_{DA}^{Hintergrund} - ct_{Lösung} \cdot I_{DD}^{Hintergrund} - de_{Lösung} \cdot I_{AA}^{Hintergrund} \quad (3.11)$$

Zuletzt gilt es durch den γ -Faktor, siehe Gleichung 3.12, die jeweiligen Quantenausbeuten (ϕ) und die Detektionseffizienz (η) zu erstellen

$$\gamma = \frac{\phi_A \cdot \eta_A}{\phi_D \cdot \eta_D} \quad (3.12)$$

Die Unterschiede in der Intensität der jeweiligen Anregung ($I_{A/D}^{an}$) und den jeweiligen Absorptionsquerschnitten ($\sigma_{A/D}$) wird durch die Einführung von β korrigiert.

$$\beta = \frac{I_A^{an} \cdot \sigma_A}{I_D^{an} \cdot \sigma_D} \quad (3.13)$$

In der praktischen Realisierung wird dazu der Kehrwert der korrigierten Stöchiometrie S gegen die korrigierte FRET-Effizienz E aufgetragen. Diese Werte ergeben sich aus den Mittelpunkten der Population unterschiedlicher Proben. Aus der Steigung m und dem y-Achsenabschnitt der linearen Regression kann experimentell der β - und der γ -Wert bestimmt werden, siehe folgende Gleichungen 3.14 und 3.15:

$$\beta = y + m - 1 \quad (3.14)$$

sowie

$$\gamma = \frac{y - 1}{y + m - 1} \quad (3.15)$$

Mit diesen Faktoren können der Stöchiometriefaktor S und die Energieübertragungseffizienz E korrigiert werden.

$$E_\gamma = \frac{I_{FRET}}{I_{FRET} + \gamma \cdot I_{DD}^{Hintergrund}} \quad (3.16)$$

und

$$S_\gamma = \frac{I_{FRET} + \gamma \cdot I_{DD}^{Hintergrund}}{I_{FRET} + \gamma \cdot I_{DD}^{Hintergrund} + \beta \cdot I_{AA}^{Hintergrund}} \quad (3.17)$$

Mit Hilfe dieser korrigierten FRET-Effizienz kann ein entsprechendes Histogramm der Energieübertragungseffizienz erstellt werden. Dabei sind lediglich Ergebnisse berücksichtigt worden, die eine Stöchiometrie von $0,3 < S < 0,7$ aufweisen [188]. Aus der mittleren FRET-Effizienz kann abschließend die quantitative Umrechnung auf den entsprechenden Abstand erfolgen.

3.2.3 Bestimmung des Überlappintegrals und des Förster-Radius

Um den Förster-Radius R_0 für das verwendete FRET-Paar *ATTO[®]542* und *Abberior STAR RED* zu berechnen, wird zunächst das Überlappintegral J aus dem Emissionsspektrum des Donors F_D und dem Extinktionskoeffizienten des Akzeptors nach Formel 2.9 bestimmt. Dazu werden die jeweiligen Spektren beider Farbstoffe abgerufen [169] [172] und im Überlappungsbereich zwischen Donor-Emission und Akzeptor-Absorption flächennormiert. Für das

eingesetzte FRET-Paar erstreckt sich dieser Überlapp von 520 nm bis 709 nm. Die Flächennormierung wird in *OriginPro®*, einer wissenschaftlichen Softwareanwendung im Bereich Datenanalyse und grafischer Darstellung [189], durchgeführt. Das erhaltene normierte Emissionsspektrum des Donors F_D wird nach Formel 2.9 als Produkt des wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten des Akzeptors $\varepsilon_A(\lambda)$ und der Wellenlänge über den Überlappungsbereich integriert. Das erhaltene Überlappintegral J wird in Formel 2.10 überführt. Mit der Quantenausbeute des Donors Φ_D [172], dem Brechungsindex des Mediums ($n=1,33$) und der mittleren relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente der Farbstoffe zu einander ($\kappa^2=2/3$) ergibt sich für das verwendete FRET-Paar ein Förster-Radius von

$$R_0 = 6,72 \text{ nm}$$

Eingesetzt in Formel 2.8 ergeben sich mit den designten Abständen die in folgender Tabelle 3.2 gezeigten E-Werte:

Tabelle 3.2: Erwartungswerte der FRET-Messungen

theoretischer Abstand r [nm]	erwarteter E-Wert
5,9 (crossover)	0,69
6	0,66
5,9 (ohne crossover)	0,69

Die in Tabelle 3.2 gezeigten erwarteten E -Werte sind für die theoretischen Abstände auf der DNA-Origami Nanostruktur berechnet worden. Diese sind identisch, sodass eine eindeutige Trennung der Ergebnisse als schwierig einzustufen ist.

Für das FRET-Paar aus *ATTO®542* und *ATTO®647N* ist ebenfalls ein Försterradius zu bestimmen. Das neue erhaltene Überlappintegral J (siehe Kapitel 3.2.3) wird in Formel 2.10 überführt. Mit der Quantenausbeute des Donors Φ_D [176], dem Brechungsindex des Mediums ($n=1,33$) und der mittleren relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente der Farbstoffe zu einander ($\kappa^2=2/3$) ergibt sich für das verwendete FRET-Paar ein Förster-Radius von

$$R_0 = 6,69 \text{ nm}$$

Für den hier untersuchten Abstand von 6 nm ergibt sich aus Formel 2.8 der in folgender Tabelle 3.3 gezeigte E-Wert:

Tabelle 3.3: Erwartungswerte der FRET-Messungen für *ATTO*[®]647N

theoretischer Abstand r [nm]	theoretischer E-Wert
5,9 crossover	0,68
6	0,65
5,9 (ohne crossover)	0,68

Der in Tabelle 3.3 gezeigte erwartete E -Wert für den theoretischen Abstand auf den DNA-Origami Nanostrukturen ist identisch mit dem E-Wert des *Abberior STAR RED*, siehe Tabelle 3.2.

3.2.4 Rasterkraftmikroskopie

Um die aufgereinigten DNA-Origami Nanostrukturen auf ihre korrekte Faltung hin zu untersuchen, wurden diese mit Hilfe eines *NanoWizard 3 ultra* Rasterkraftmikroskops (**A**tomic **F**orce **M**icroscope (AFM), JPK Instruments AG) abgebildet. Eine feine Nadel (Cantilever *USC-F0.3-k0.9-5 Nano World*), welche an einer Blattfeder befestigt ist, rasterte die Probe nun zeilenweise ab. Rastert die Nadel im sogenannten *Kontaktmodus* über eine Nanostruktur, ändert sich aufgrund der Topographie die auf die Spitze wirkende Kraft. Die dadurch entstehende Auslenkung lässt sich durch einen optischen Sensor messen und in ein elektrisches Signal zur Bildgebung umwandeln [190] [191]. Dies spiegelt die atomaren Kräfte zwischen Probe und Nadel wieder.

Zur Untersuchung der Nanostrukturen mittels AFM wurden Mica-Oberflächen (Qualität V1, **Plano GmbH**) als Trägersubstrat verwendet. Diese sind die am häufigsten genutzten Oberflächentypen, da sich ihre nicht kovalent verknüpften Schichten homogen entfernen lassen, was wiederum zu einer atomaren Ebene zur Bindung der DNA-Origami Nanostrukturen führt [192]. Nachdem die obersten Schichten der Mica-Oberfläche entfernt wurden, sind diese mit Nickelchloridlösung (NiCl_2 , 10 mM in PBS) behandelt worden. Nickelionen binden aufgrund ihrer positiven Ladung stark elektrostatisch an die Mica-Oberfläche, verhindern so die Abstoßung der ebenfalls negativ geladenen DNA [193] und dienen durch ihre zweifach positive Ladung als Bindungssion. Nach einer Inkubationszeit von 3-5 Minuten wurde die Oberfläche mehrmals mit Wasser gespült und nachfolgend luftgetrocknet. Die Proben sind in einer Konzentration von ~ 1 nM auf die Oberfläche gegeben und inkubiert worden. Die DNA-Origamis für die Vermessung verschiedener Abstände wurden für 3-5 Minuten inkubiert. Die Nanostrukturen, an welche bereits das Protein HFQ gekoppelt war, wurden für 10 Minuten inkubiert. Daraufgehend sind die Oberflächen mehrmals mit 1x TAE Puffer (12 mM MgCl_2) gespült worden. Für die Messung wurden letztlich 300 μL des 1x TAE-Puffers auf die Oberfläche gegeben. Die Probe ist anschließend in den Probenhalter gesetzt und vermessen worden [49]. Für eine Gesamtübersicht ist ein

Ausschnitt von $9\text{ }\mu\text{m}^2$ ab gerastert worden. Die Spannung wurde hierbei in einem Bereich von $0,6\text{--}0,7\text{ V}$ gewählt. Dabei verhält sich die angelegte Spannung antiproportional zur wirkenden Kraft. Die Geschwindigkeiten, mit der die Proben untersucht wurden, betrugen $0,5\text{--}1\text{ Hz}$. Je niedriger die gewählte Geschwindigkeit der Nadel, desto besser wird die Auflösung der Probe. Die Bildanalyse wurde mit der *JPK Data Processing Software* von JPK Instruments AG durchgeführt⁷.

⁷Die Messungen und Bildanalysen wurden unterstützt von M.Sc. Johann Bohlen und M.Sc. Rainer Matis

4 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt und diskutiert. Zunächst sind die Resultate der AFM-Messungen vorgestellt, die einen Einblick geben, inwieweit die DNA-Origamis für die Superauflösungs- und FRET-Experimente die korrekte Struktur aufweisen. Daraufgehend werden die jeweiligen Ergebnisse der Superauflösungs- und FRET-Experimente am Weitfeld-Mikroskop präsentiert. Um die dort erhaltenen Ergebnisse zu prüfen, sind die Nanostrukturen auf einem für FRET-Experimente etabliertem konfokalen Mikroskop untersucht worden.

Für die quantitative Auswertung ist der Akzeptorfarbstoff für die Vermessung der Nanostrukturen mit integrierten Farbstoffmolekülen an diesem Aufbau in Lösung durch den *ATTO[®]647N* ersetzt worden. Dieser ist bereits als FRET-Farbstoff etabliert und kann die erhaltenen Ergebnisse somit adäquat als Referenz validieren.

Anschließend werden die Resultate der AFM-Messungen der mit dem HFQ-Protein assemblierten Nanostrukturen vorgestellt, bevor die entsprechenden Resultate der Superauflösungsmikroskopie gezeigt werden. Ebenso sind die Ergebnisse der diversen bereits erwähnten Kontrollexperimente dargestellt.

4.1 Überprüfung der korrekten Faltung von DNA-Origami Nanostrukturen für die Superauflösungsmikroskopie

Nachdem die DNA-Origami Nanostrukturen nach Angaben der Kapitel 3.1.4 sowie 3.1.5 gefaltet und aufgereinigt wurden, ist die Überprüfung der Proben mittels AFM durchgeführt worden. Die Proben wurden gemäß Kapitel 3.2.4 vorbereitet und gemessen. In Abbildung 4.1 ist beispielhaft eine AFM-Aufnahme der DNA-Origami Nanostrukturen für den designten Abstand von 6 nm gezeigt.

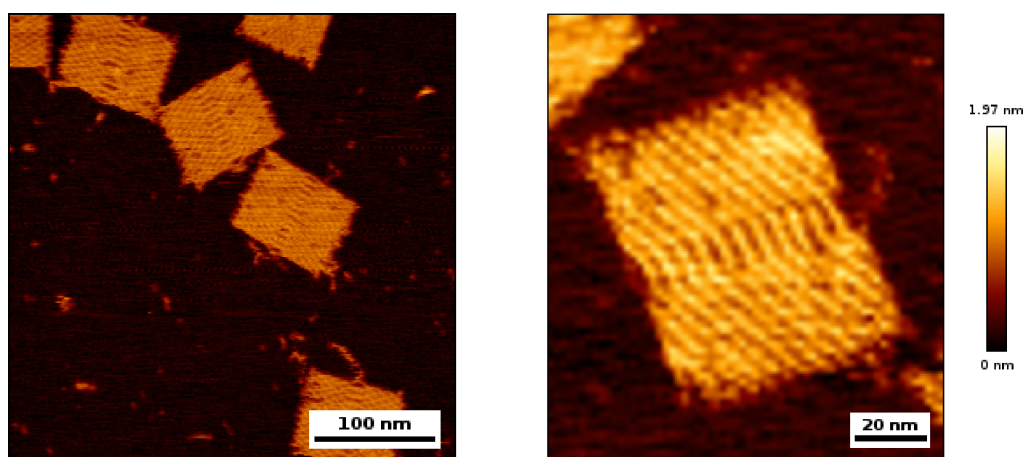


Abbildung 4.1: Rasterkraftmikroskopaufnahmen der rechteckigen DNA-Origami Nanostruktur. Links ist eine Übersicht mit einer Skalierung von 100 nm, rechts eine Nahaufnahme einer einzelnen Struktur mit einer Skalierung von 20 nm und zusätzlicher Höhenskalierung gezeigt.

Links in Abbildung 4.1 ist eine Übersicht der DNA-Origami Nanostrukturen gezeigt. Deutlich ist deren rechteckige Form zu erkennen. Auch einzelne Helices sind sichtbar. Die hier abgebildeten Strukturen weisen keine schwerwiegenden Defekte auf. Vereinzelt erscheinen die kurzen Seiten faserig. Dies wird durch überschüssigen *Scaffold* bedingt, der sich um die Struktur legt, um die Bildung von Aggregaten zu verhindern. Rechts in Abbildung 4.1 ist eine Vergrößerung eines einzelnen DNA-Origamis gezeigt. Die rechteckige Form sowie die Helices sind deutlich zu erkennen. Die gezeigte Höhenskalierung mit einem Maximum von etwa 2 nm bestätigt den in diverser Literatur angegebenen helikalen Durchmesser [194] [195]. Für die Superauflösungs- und FRET-Experimente sind jeweils zwei DNA-Einzelstränge verlängert worden. Diese ragen maximal 7,48 nm aus dem DNA-Origami hinaus, sind allerdings zu flexibel – Einzelsträngige DNA verfügt über eine Persistenzlänge von 1 nm [196] – sodass sie nicht gesondert abgebildet werden. Ob diese letztlich korrekt im DNA-Origami vorhanden sind, wird durch die Superauflösungs- oder FRET-Experimente geklärt.

4.2 Ergebnisse der Superauflösungsmikroskopie

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Superauflösungsmikroskopie mittels DNA-PAINT vorgestellt. Dazu wurden die nach Kapitel 3.1.2 beschriebenen DNA-Origami Nanostrukturen eingesetzt und entsprechend Kapitel 3.1.6.3 für die DNA-PAINT Messung vorbereitet. Die Auswertung erfolgte nach Angaben aus Kapitel 3.2.1.2.

4.2.1 Ergebnisse der DNA-PAINT-Messung von Abständen im Bereich von 6 nm

Die erhaltenen Ergebnisse der DNA-PAINT-Messungen werden hier mit zunehmendem Abstand vorgestellt. Die Abstände zwischen den gefundenen Spots werden automatisch bestimmt und zusätzlich manuell überprüft. Die Abstände wurden hinsichtlich ihrer Häufigkeit gezählt und in ein Histogramm übertragen, welches mit einer Gauß-Funktion angenähert wird. Das Maximum spiegelt den mittleren Abstand zwischen den Punktlichtquellen auf den untersuchten DNA-Origami Nanostrukturen wieder.

Abbildung 4.2 zeigt die Ergebnisse der superaufgelösten Darstellung zweier Spots in einem designten Abstand von 5,9 nm mit dem *Abberior STAR RED*, der sich zwischen dem crossover befand, vergleiche Abbildung 3.3.

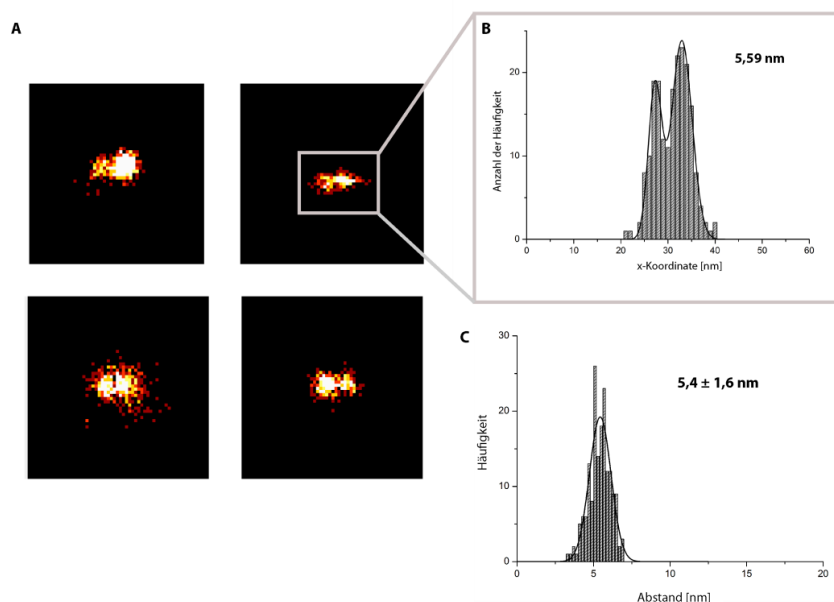


Abbildung 4.2: Ergebnisse der DNA-PAINT Messung an Nanostrukturen mit einem designten Abstand von 5,9 nm zwischen dem crossover. A: Exemplarische Doppelspots (30 · 30 Pixel) mit einem Binning von 1 nm pro Pixel. B: Querschnittshistogramm der Lokalisationssumme eines Spots. C: Histogramm über alle analysierten Abstände.

Dargestellt sind in Abbildung 4.2 A vier beispielhafte Spots, welche in die Analyse eingegangen sind. Es zeigen sich jeweils zwei Anhäufungen an Lokalisationen, welche in der Mitte durch einen schmalen Spalt getrennt werden. Die Anzahl der Lokalisationen ist durch die Farbgebung definiert. Je häufiger ein Fluoreszenzfarbstoff wiederholt an derselben Stelle detektiert wird, desto heller erscheint dieser im superaufgelösten Bild. Die Lokalisationssummen werden in einem Querschnittshistogramm dargestellt, aus dem der Abstand ermittelt

wird, vergleiche dazu Abbildung 4.2 B. Der betrachtete Spot verfügt über zwei Maxima, die einen Abstand von 5,59 nm zueinander aufweisen. Dieser und die weiteren analysierten Abstände werden vermerkt und entsprechend der auftretenden Anzahl histogrammiert. Das Ergebnis für den theoretischen Abstand von 5,9 nm ist in Abbildung 4.2 C gezeigt. Aus den Messreihen dieser DNA-Origami Nanostrukturen ergibt sich ein mittlerer Abstand von **$5,4 \pm 1,6$ nm**.

Für die Reproduktion der in [11] dargestellten Ergebnisse wurde dasselbe Design mit dem *Abberior STAR RED* als neuem DNA-PAINT-Farbstoff untersucht. Die nachfolgende Abbildung 4.3 zeigt die entsprechenden Ergebnisse.

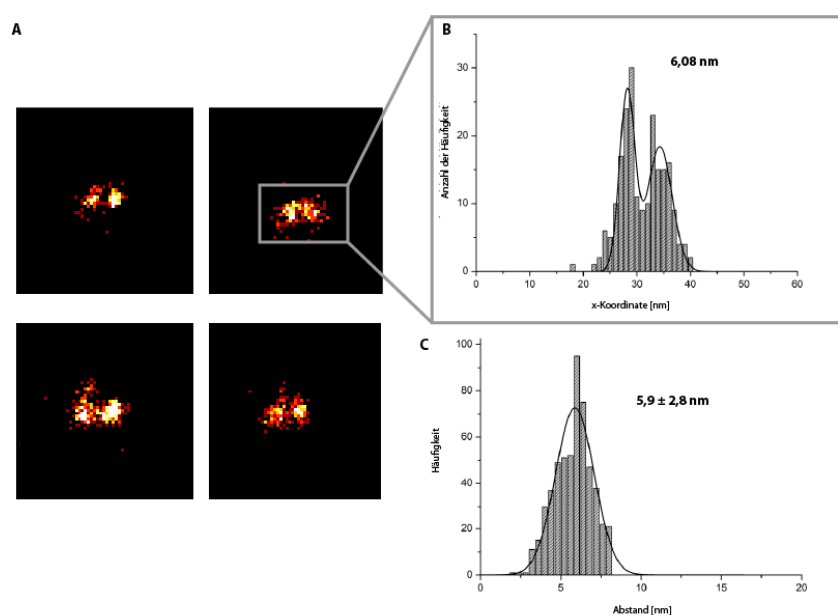


Abbildung 4.3: Ergebnisse der DNA-PAINT Messung an Nanostrukturen mit einem designierten Abstand von 6 nm. A: Exemplarische Doppelspots (30 · 30 Pixel) mit einem Binning von 1 nm pro Pixel. B: Querschnittshistogramm der Lokalisierungssumme eines Spots. C: Histogramm über alle analysierten Abstände.

Abbildung 4.3 A illustriert vier beispielhafte Doppelspots des designierten Abstands von 6 nm, die in der Datenanalyse berücksichtigt wurden. Die in Abbildung 4.3 B gezeigte Lokalisierungssumme zur Abstandsbestimmung wurde aus dem hervorgehobenen Spot generiert, vergleiche Kapitel 3.2.1.2. Für jede Struktur sind diese zwei Maxima durch eine doppelte Gauß-Verteilung genähert und deren Differenzen bestimmt worden. Alle analysierten Abstände werden in einem Histogramm dargestellt, siehe Abbildung 4.3 C. Für den theoretischen Abstand von 6 nm ergibt sich hier ein Wert von **$5,9$ nm \pm $2,8$ nm**.

Die Ergebnisse der DNA-PAINT-Messung mit dem *Abberior STAR RED* des theoretischen

Abstands zweier punktförmiger Lichtquellen von 5,9 nm ohne einen crossover zwischen den Helices sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

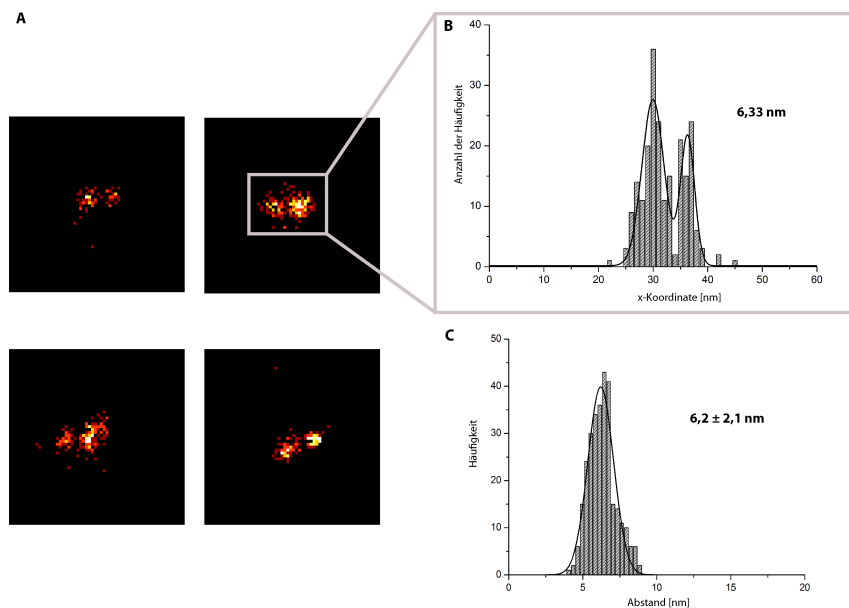


Abbildung 4.4: Ergebnisse der DNA-PAINT Messung an Nanostrukturen mit einem designten Abstand von 5,9 nm ohne crossover. A: Exemplarische Doppelspots (30 · 30 Pixel) mit einem Binning von 1 nm pro Pixel. B: Querschnittshistogramm der Lokalisierungssumme eines Spots. C: Histogramm über alle analysierten Abstände.

Abbildung 4.4 gleicht in ihrem Aufbau den bereits gezeigten und beschriebenen Abbildungen 4.2 und 4.3. Aus der beispielhaften Auswahl an Spots ist eine Strukturen exemplarisch hervorgehoben worden, um die entsprechende Lokalisierungssummen zu zeigen. Für den theoretischen Abstand von 5,9 nm ohne crossover wird ein Wert von **6,2 nm ± 2,1 nm** erhalten, vergleiche Abbildung 4.4 C.

Die Ergebnisse der suprauflösenden DNA-PAINT Mikroskopie zeigen, dass Abstände im Bereich von 6 nm erfolgreich mit dem *Abberior STAR RED* und einem ROXS-Puffer aufgelöst werden. Der gemessene Abstand von 6 nm liegt nah am theoretischen Wert und bestätigt die Zuverlässigkeit des Designs und der Auswertemethode. Ein ähnliches Ergebnis wurde in [11] veröffentlicht. Der designte Abstand von 6 nm wird von Raab et al. mittels *ATTO[®]655* experimentell untersucht, wobei ein Abstand von 6,3 nm ± 1,3 nm resultiert [11]. Dieser spiegelt bereits die gute Reproduzierbarkeit des erwarteten Ergebnisses wieder. Anders als der *Abberior STAR RED* benötigt der *ATTO[®]655* kein ROXS-System, sondern kann in gängigen Messpuffern wie PBS eingesetzt werden, um die erfolgreiche Auflösung eines Abstands von 6 nm zu realisieren. *ATTO[®]655* ist vor diesem Hintergrund ein besonders häufig eingesetzter Farbstoff [10] [11] [29] [138]. Die starke Absorption, die

photochemische Stabilität sowie die hohe Fluoreszenzquantenausbeute des Farbstoffs qualifizieren ihn besonders für den Bereich der supraaufgelösenden Fluoreszenzmikroskopie [171]. Um komplexe Puffersysteme und somit einen weiteren Unsicherheitsfaktor [71] zu vermeiden, sollte der *ATTO[®]655* aufgrund seiner Eigenschaften in gängigen Messpuffern vornehmlich für die supraauflösende Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden. Für den Einsatz des *Abberior STAR RED* sprach vor allem seine Fluoreszenzquantenausbeute von 90 %. Eine hohe Anzahl an detektierten Photonen impliziert eine schmale PSF und somit eine hohe Lokalisationsgenauigkeit [131].

Die Abweichung zwischen theoretischen und experimentellen Abstand ist auf Fehler in der Lokalisationsgenauigkeit zurück zu führen. Weiterhin ist das NRO nicht gänzlich planar und auch die Salzkonzentration hat Einfluss auf die Stauchung oder Streckung der DNA [49]. Diese Faktoren können jedoch nicht die starke Abweichung für den Abstand zwischen dem crossover erklären. Wie in Kapitel 3.1.2 bereits angedeutet, kann es durch den crossover zu einer Verzerrung der theoretischen Abstände kommen. Die DNA als elastisches Material wird durch diese wechselseitige Bindung zu einer Rautenstruktur verzerrt wie in [163] gezeigt. Bai et al. [163] untersuchten ein quadratisches Gitter mittels Cryo-Elektronenmikroskopie, dass alle 8 Basenpaare miteinander verknüpft war. Die entsprechend relevante Abbildung der Veröffentlichung ist im Folgenden gezeigt:

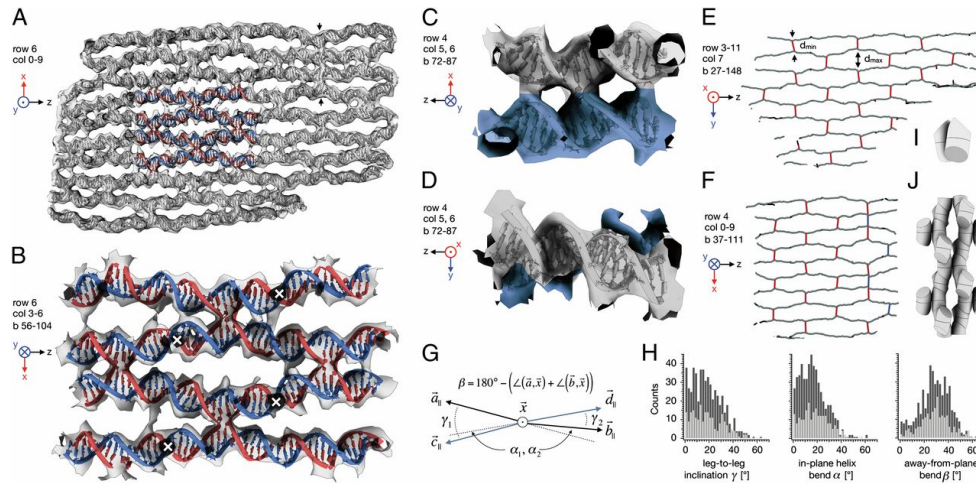


Abbildung 4.5: Figure 3 aus [163]. Durch den crossover wird die DNA an diesen Stellen zusammengezogen, wodurch sich eine Verzerrung der Helices zu einer Raute ergibt, siehe Figure 3 A und B. Dies hat wiederum Einfluss auf die zu vermessenden Abstände innerhalb der Nanostruktur (Figure 3 E und F). Die Verwendung der Figure 3 in dieser Arbeit ist durch PNAS genehmigt worden, siehe Anhang A.5.

Dadurch ergab sich eine rautenähnliche Struktur, die an ihrer weitesten Stelle 3,6 nm breit ist. Der Abstand in einem crossover betrug 1,85 nm. Werden diese Werte für die Berechnung des Abstands für das in Abbildung 3.3 gezeigte Design verwendet, ergeben sich

exakt die vermessen Werte von 5,4 nm und 6,2 nm. Die Abstände aus [163] können jedoch nicht direkt übernommen werden. Im Design des in dieser Arbeit genutzten NRO sind die crossover alle 16 Basenpaare gesetzt, sodass eine gestrecktere Rautenstruktur zu erwarten ist, deren exakte Abmessungen nicht bekannt sind. Die Theorie der Verzerrung durch den crossover kann weiterhin durch eine strukturelle Darstellung des NRO durch die Firma **GATTAQUANT GmbH** gestützt werden. In der folgenden Abbildung 4.6 ist eine in Kooperation mit **Oxford Instruments Asylum Research** entstandene detaillierte AFM-Aufnahme der in dieser Arbeit genutzten DNA-Origami Nanostruktur gezeigt.

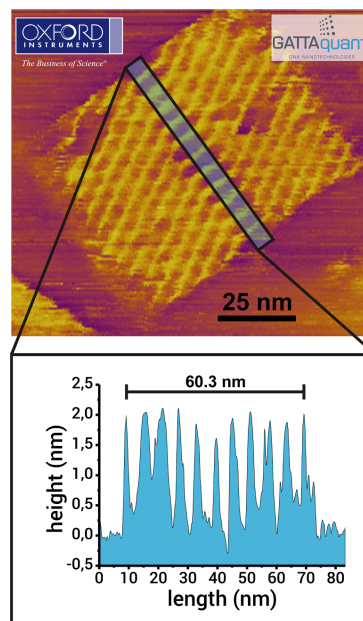


Abbildung 4.6: AFM Nanoruler der Firma **GATTAQUANT GmbH** [138], welches in der Mitte eine rautenähnliche Struktur zeigt. In diesem Bereich finden sich die in dieser Arbeit vermessenen Abstände. Die Verwendung der Datendarstellung wurde durch [138] genehmigt.

Der in Abbildung 4.6 blau unterlegte Bereich kennzeichnet die Region, in denen die Abstände dieser Arbeit generiert wurden. Es zeigt sich ein Muster, in dem ein etwa 6 nm breiter Spalt sowie zwei eng beieinander liegende Helices vorliegen. Genaue Abstände sind aufgrund der begrenzten Auflösung des AFM nicht zu bestimmen. Abbildung 4.6 bestätigt die gemessene Abweichung der Abstände bedingt durch den dazwischen liegenden crossover. Üblicherweise wird ein Abstand zwischen den Helices zu 1 nm bei regelmäßigen Strukturen angenommen, siehe Kapitel 3.1.2. Durch das vorliegende Design wird diese Regelmäßigkeit in der Mitte der Nanostruktur gebrochen, sodass eine Rautenstruktur entsteht. Somit wird der interhelikale Abstand größer. Dieses Phänomen kann durch die Ergebnisse der FRET-Experimente genauer verifiziert werden. Entsprechen die FRET-Werte den gemessenen Abständen ist bestätigt, dass der crossover die DNA an entsprechenden Stellen beeinflusst und dadurch die Position der *docking strands* verändert.

4.3 Ergebnisse der FRET-Experimente

Für die FRET-Experimente wurde die in Kapitel 3.1.2 beschriebene Nanostruktur eingesetzt und entsprechend Kapitel 3.1.6.3 vorbereitet. Die Messungen am Weitfeld-Aufbau wurden bei einer Bildfrequenz von 10 Hz durchgeführt. Die Leistung des roten Lasers betrug 100 – 150 mW, die des grünen Lasers 300 mW. Die Auswertung erfolgte nach Kapitel 3.2.1.

4.3.1 Ergebnisse der FRET-Messung von designten Abständen im Bereich von 6 nm am Weitfeld-Setup

In der folgenden Abbildung 4.7 sind exemplarische Spuren des Weitfeld-Aufbaus für den theoretischen Abstand von 5,9 nm zwischen dem crossover gezeigt. Dargestellt sind der Donor *ATTO[®]542* (grüne Anregung/grüne Detektion), der FRET-Kanal (grüne Anregung/rote Detektion) sowie der Akzeptor *Abberior STAR RED* (rote Anregung/rote Detektion). Zusätzlich sind die erhaltenen Häufigkeitszahlen der E-Werte dargestellt.

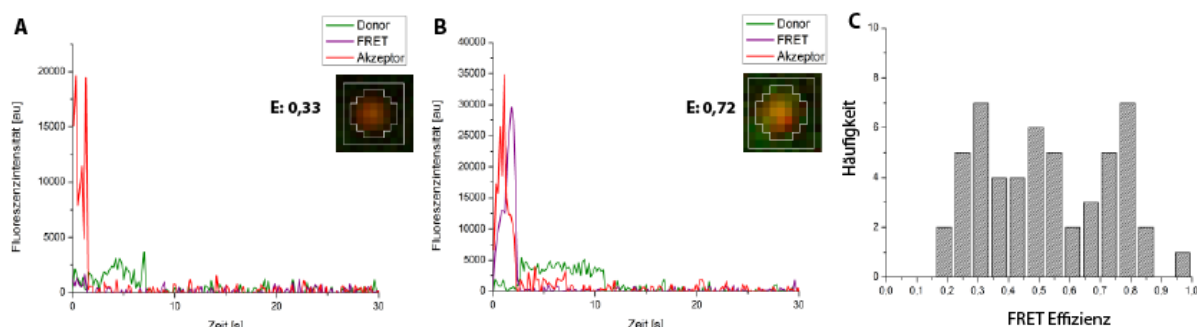


Abbildung 4.7: FRET-Spuren und deren Auswertung für einen Abstand von 5,9 nm zwischen dem crossover. A und B: Spur mit den jeweiligen Intensitäten des Donors (grün), des Akzeptors (rot) und der daraus resultierenden FRET-Spur (violett). Zusätzlich ist ihr entsprechender Bildpunkt gezeigt. Beide Spuren zeigen unterschiedliche E-Wert. C: Häufigkeitsverteilung der E-Werte.

Bei den FRET-Messungen des designten Abstands zwischen Donor und Akzeptor von 5,9 nm zwischen dem crossover liegt eine sehr breite Verteilung von FRET-Werten vor. Dies ist in Abbildung 4.7 A und B beispielhaft durch die gezeigten Spuren illustriert. In Abbildung 4.7 A wird aus der erhaltenen FRET-Spur ein E-Wert von 0,33 erhalten. Die Intensitätsspur des Akzeptor bleicht bereits kurz nach dem Beginn der Messung, woraufhin die Intensität des Donors minimal und leicht verzögert zunimmt. Die FRET-Spur fällt mit dem Anstieg der Donorintensität ab. Zusätzlich ist der ausgewählte Spot der Überlagerung des grünen und roten Kanals unter der Legende gezeigt, aus der die entsprechende Spur generiert wurde. In Abbildung 4.7 B ist der Anstieg der Donorintensität nach dem Akzeptorbleichen deutlich intensiver. Dies impliziert eine höhere Energieübertragung. Niedrige E-Werte werden im

Folgenden durch den Begriff *low FRET* ausgedrückt. Hohe E -Werte werden als *high FRET* bezeichnet. Um absolute Distanzen reproduzieren zu können, sind die FRET-Werte aller Spuren zusätzlich gegen *direct excitation* und *cross talk* zu korrigieren. Diese Korrekturfaktoren konnten nicht eindeutig bestimmt werden und sind nicht verwendet worden. Der Grund dafür ist die Kurzlebigkeit der analysierten Spuren als auch die Fluktuation des Akzeptors. Abbildung 4.7 C zeigt die Häufigkeitsverteilung der für diesen Abstand vermessenen, nicht korrigierten E -Werte. Diese Häufigkeiten werden üblicherweise durch eine Normalverteilung oder im Falle zwei deutlich getrennter Populationen durch eine doppelte Gaußfunktion angepasst, wodurch ein mittlerer Gesamtwert der Energieübertragung resultiert. In diesem Fall ist die Verteilung der FRET-Werte breit gestreut und zeigt mehrere Maxima, wodurch eine quantitative Auswertung nicht zugelassen wird.

In der folgenden Abbildung 4.8 sind die Ergebnisse für einen Abstand von 6 nm gezeigt. Die Darstellung der Spuren entspricht Abbildung 4.7.

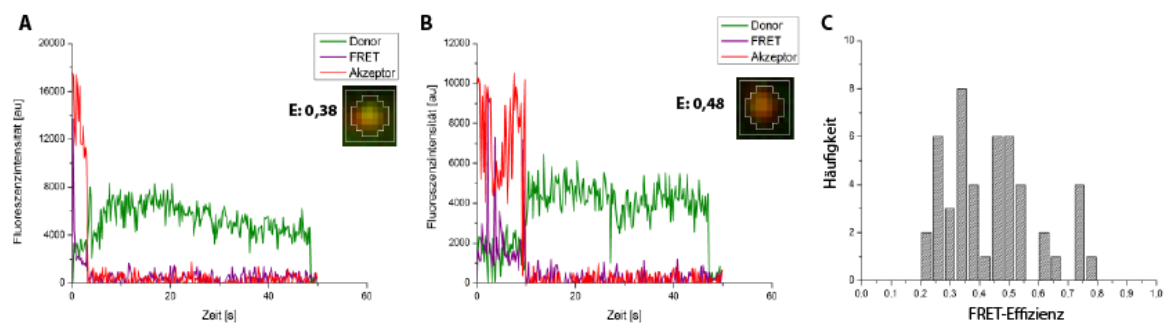


Abbildung 4.8: FRET-Spuren und deren Auswertung für einen Abstand von 6 nm. A und B: Spur mit den jeweiligen Intensitäten des Donors (grün), des Akzeptors (rot) und der daraus resultierenden FRET-Spur (violett). Zusätzlich ist ihr entsprechender Bildpunkt gezeigt. C: Häufigkeitsverteilung der E -Werte.

Die FRET-Messungen des designten Abstands zwischen Donor und Akzeptor von 6 nm zeigen ebenfalls eine breite Verteilung von FRET-Werten. Häufig tritt, wie in Abbildung 4.8 A illustriert, der *low FRET* auf. Abbildung 4.8 B zeigt einen höheren FRET-Wert von 0,48. Der Anstieg der Donorintensität ist intensiver und markanter als bei der gezeigten *low FRET* Spur. Neben den E -Werten sind in den entsprechenden Abbildungen die Spots der Überlagerung des grünen und roten Kanals, aus der die entsprechende Spur generiert wurde, gezeigt. Fluktuationen in der Akzeptorspur sind deutlich zu erkennen, siehe Abbildung 4.8 B. Auch für diese Messreihe konnten keine Korrekturfaktoren für die Spuren festgelegt werden. Alle erhaltenen, nicht korrigierten E -Werte werden nach einer Häufigkeitszählung in einem Histogramm dargestellt. Hier zeigt sich eine breite, unterbrochene Verteilung an E -Werten, siehe Abbildung 4.8. Diese ließ sich ebenfalls nicht quantitativ auswerten.

In Abbildung 4.9 sind exemplarisch Spuren gezeigt, welche in die Datenanalyse bei einem Abstand von 5,9 nm ohne crossover eingegangen sind. Zusätzlich sind die E-Werte durch eine Häufigkeitsverteilung dargestellt.

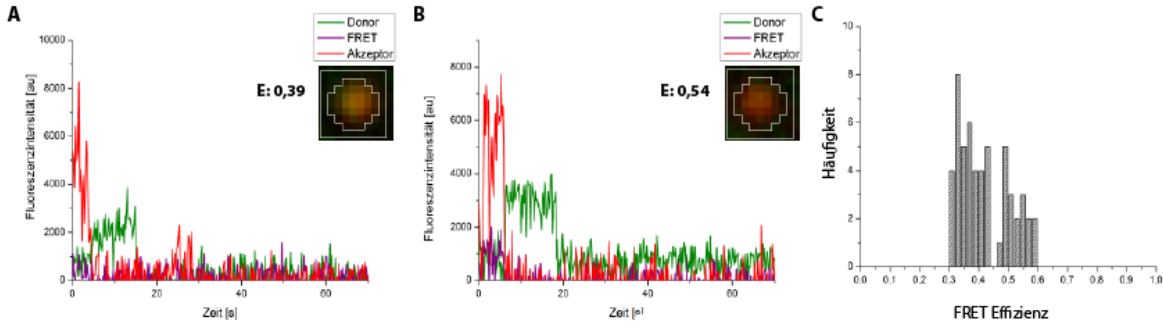


Abbildung 4.9: Beispielspuren der FRET-Messung bei einem Abstand von 5,9 nm ohne crossover. A und B: Gezeigt sind Spuren mit den jeweiligen Intensitäten des Donors (grün), des Akzeptors (rot) und der FRET-Spur (violett). Zusätzlich ist für jede Spur ihr entsprechend ausgewählter Bildpunkt gezeigt. C: Häufigkeitsverteilung der E-Werte.

Die in Abbildung 4.9 illustrierten Spuren zeigen unterschiedliche Populationen an E-Werten. Der Akzeptor zeigt erneut starke Fluktuationen. Korrekturfaktoren sind dadurch nicht festgelegt worden. Die erhaltenen, nicht korrigierten E-Werte werden nach ihrer Häufigkeit gewichtet und in einem Histogramm dargestellt. Hier zeigt sich erstmals eine deutliche Trennung der FRET-Werte. Der *low FRET*, gezeigt in Abbildung 4.9 A, liegt in einem Bereich von 0,3 bis 0,45. Der E-Wert des in Abbildung 4.9 C gezeigten *high FRET* liegt in einem Bereich von 0,47 bis 0,6. Das Zentrum der *high FRET* Verteilung liegt bei 0,54. Dieser Wert entspricht rückführend nach Gleichung 2.8 einem Abstand von 6,5 nm. Dieser weicht somit nur geringfügig vom supraaufgelösten Abstand an dieser Position ab und bekräftigt die Verzerrung der Abstände in Abhängigkeit der crossover. Eine eindeutige Annäherung der gezeigten Werte durch eine doppelte Gaußfunktion ist aufgrund der mäßigen Qualität der Intensitätsspuren und zur Wahrung der konsistenten Datenevaluation nicht durchgeführt worden. Das Verhalten des Akzeptors beeinflusst die erhaltenen Daten so stark, dass nur eine qualitative Darstellung vertretbar ist.

Die dargestellten FRET-Werte zeigen jeweils eine breite Verteilung und können diesbezüglich nur qualitativ dargestellt werden. Ein Grund kann die hohe Leistung der Laser des Weitfeld-Mikroskops auf dem fokussierten Bereich sein. Dies kann zu photoinduzierten

Reaktionen führen, die die Konformation des Farbstoffs ändern. Für den für die FRET-Messungen genutzten Farbstoff *Abberior STAR RED* scheint dies zuzutreffen, da eine breite Verteilung an FRET-Werten sowie eine mäßige Qualität der Spuren erhalten wird. Dies kann aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften (Änderung der Polarität durch die wässrige Umgebung sowie Verschiebung des π -Systems und damit verbunden Verschiebung der Fluoreszenz [197] oder Isomerieänderung [198]) entstehen. Aufgrund des Verhaltens des *Abberior STAR RED* werden zu wenig konsistente Werte der übertragenen Effizienz erzeugt, die für eine quantitative Darstellung der Ergebnisse benötigt werden. Um die Fluktuation des Farbstoffs zu reduzieren, wurden die FRET-Messungen am Weitfeld-Aufbau anfänglich unter Sauerstoffentzug und Nutzung eines ROXS-Puffers durchgeführt. Eine vergleichende Gegenüberstellung ist im Folgenden gezeigt. Dazu ist nur der Akzeptorfarbstoff *Abberior STAR RED* mit der DNA-Origami Nanostruktur verbunden und auf dem Weitfeld-Mikroskop untersucht worden. Diese Analysen sollen das Verhalten des Farbstoffs in Abwesenheit des Donors zeigen und Erkenntnisse über mögliche Ursachen für die breite Verteilung der Werte liefern. Dazu sind die Intensitätsspuren des Farbstoffs mit einer *Andor* Software analysiert worden. Die Messdauer betrug 500 Frames bei einer Bildfrequenz von 10 Hz. Zunächst ist der Farbstoff wie in den durchgeführten FRET-Messungen in PBS-Puffer mit 10 nM MgCl_2 vermessen worden. Die erhaltenen Intensitätsspuren sind in der folgenden Abbildung 4.10 gezeigt.

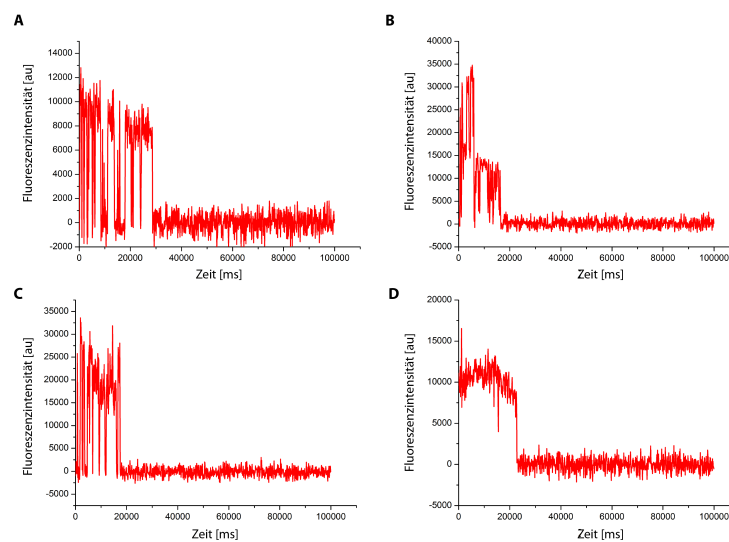


Abbildung 4.10: Intensitätsspuren des *STAR RED* ohne ROXS. Die Teilbilder A-D zeigen verschiedene Verläufe der Intensität des Farbstoffs, die dessen Verhalten in Abwesenheit des Donors zeigen.

Abbildung 4.10 zeigt vier beispielhafte Intensitätsspuren, die für den *Abberior STAR RED* charakteristisch gemessen worden sind. Abbildungen 4.10 A und C zeigen eine starke Fluktuation des Farbstoffs bis er nach maximal 3 s bleicht. In Abbildung 4.10 B zeigt die

Intensitätsspur zwei Stufen, die entweder zwei gebundene Farbstoffe oder eine Zustandsänderung eines einzelnen Moleküls zeigen. Alle drei Intensitätsspuren implizieren, dass der Farbstoff während der Messung keine konstanten Eigenschaften zeigt, die eine verlässliche FRET-Messung zulassen. Durch unterschiedliche Zustände ändert sich der Förster-Radius R_0 und mehr als ein FRET-Wert wird bestimmt. Lediglich Abbildung 4.10 D zeigt einen relativ konstanten Verlauf über etwa 2 s. Dieser ist im Idealfall zu erwarten, wurde allerdings nur in 5 % der untersuchten Intensitätsspuren gefunden.

Die Fluktuation und kurze Emissionszeit des Farbstoffs lässt sich möglicherweise durch die Verwendung eines ROXS-Puffers positiv beeinflussen. Die Probe ist dazu in 1 mM AA, 1 mM MV, 1 % Glukose sowie Glukoseoxidase und Katalase [170] vermessen worden. Die vorherigen Einstellungen am Weitfeld-Aufbau wurden für eine vergleichbare Gegenüberstellung beibehalten. Abbildung 4.11 zeigt die erhaltenen Intensitätsspuren.

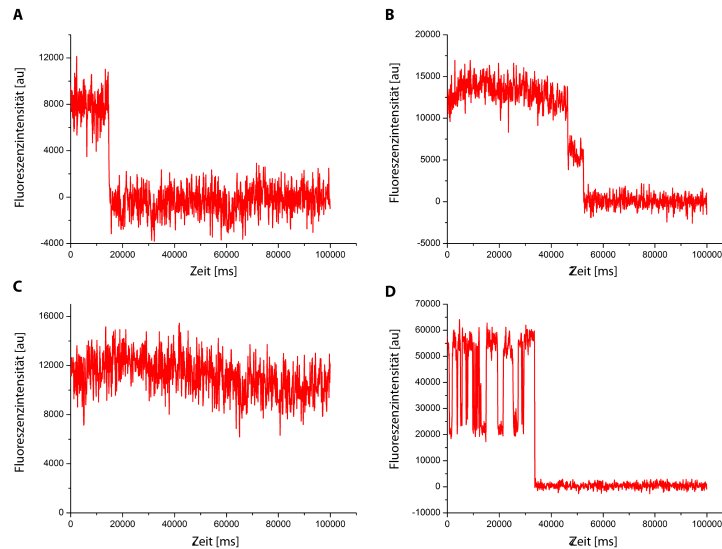


Abbildung 4.11: Intensitätsspuren des *STAR RED* mit ROXS. Die Teilbilder A-D zeigen verschiedene Verläufe der Intensität des Farbstoffs, die dessen Verhalten in Abwesenheit des Donors zeigen.

Abbildung 4.11 A zeigt eine konstante Spur, die idealerweise erwartet wird. Trotz O_2 -Entzug und Nutzung eines ROXS-Puffers ist die Emissionsdauer des Farbstoffs nicht wesentlich verlängert. Ähnlich wie in Abbildung 4.10 D bleicht der Farbstoff nach etwa 2 s. Solche Spuren sind ebenfalls in den wenigsten untersuchten Molekülen (5 %) erfasst worden. Häufiger wurden Verläufe quantifiziert, die in Abbildungen 4.11 B bis D dargestellt sind. Der Farbstoff zeigt zwei Stufen bis seine Intensität nach ~ 5 s erlischt. Diese sind möglicherweise auf zwei gebundene Moleküle oder unterschiedliche Zustände zurückzuführen. Eine deutlich verlängerte Dauer der Emission zeigt sich in Abbildung 4.11 C. Hier emittiert der Farbstoff noch bei Ende der Messung. Der Farbstoff konnte durch die maximale Leistung von 150 mW des roten Lasers nicht in den Aus-Zustand überführt werden. Dieses Phänomen war der

Hauptgrund für den Verzicht eines ROXS-Puffers bei den FRET-Messungen. Der Verlauf der Intensitätsspur in Abbildung 4.11 D zeigt eine deutliche Fluktuation des Farbstoffs, die die breite Verteilung von FRET-Werten erklären kann. Der Einsatz eines ROXS-Puffers zeigte im Vergleich zu Messungen ohne diesen Puffer keine nutzbare Verbesserung des Akzeptorsignals.

Aufgrund der mechanischen Ansteuerung der Verschlussblenden am Weitfeld kann hier die Alternierung erst ab 10 Hz ($\hat{=}$ 100 ms) realisiert werden. Die am Weitfeld-Setup eingesetzten Verschlussblenden sind nicht für den dauerhaften Einsatz als Alternierungsmodul gedacht. Diese werden gewöhnlich manuell betätigt, um den Anregungslaserstrahl für einen längeren Zeitraum zu blockieren, beispielsweise bei einem Probenwechsel. Die Alternierung bei einer Frequenz von 10 Hz führt bereits nach kurzer Zeit zur kurzfristigen oder dauerhaften Blockade der Verschlussblenden. Die Kanäle werden dadurch nicht mehr abwechselnd mit Laserlicht bestrahlt wird. Diese Unregelmäßigkeit erschwert unter anderem die Bestimmung der Korrekturfaktoren. Der elektronisch gesteuerte AOTF des konfokalen Mikroskops ist bei der Aufnahme der Spuren im Vergleich 100 mal schneller, was sich in der deutlich kürzeren Messzeit und der feineren Darstellung der einzelnen Spuren zeigt, siehe folgendes Kapitel 4.3.2. Durch das schnelle gleichmäßige Alternieren erfolgt eine einheitliche Anregung der Probe, die wiederum zu gleichmäßigen Spuren führt. Auch werden durch den Einsatz des *Optosplit* viele Photonen durch die optischen Komponenten absorbiert, sodass sie nicht bis zur Kamera gelangen.

Ein weiterer Faktor ist die Beweglichkeit der Farbstoffe, die durch das gewählte Design möglicherweise eingeschränkt ist. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Nanostrukturen zeigen die Farbstoffe direkt zum DNA-Origami hin, um die gleiche Position der Farbstoffe in den jeweiligen Experimenten zu gewährleisten. FRET-Experimente an DNA-Origami Nanostrukturen werden üblicherweise so designt, dass die gekoppelten Farbstoffe nicht in ihrer freien Rotation eingeschränkt sind und von der Nanostruktur fort zeigen [199]. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind als strahlende Dipole zu verstehen, die ein Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmoment besitzen, welche durch die Struktur gegeben sind [200]. Unterschiedliche Orientierungen dieser Übergangsdipolmomente führen zu einer Depolarisation des linear eingestrahlt Lichtes. Dieses Phänomen wird als *Fluoreszenzanisotropie* bezeichnet und ist ein Maß für die freie Beweglichkeit des Farbstoffes. Werden Fluorophore an ein Makromolekül beispielsweise an ein Protein gebunden, erhöht sich die Rotationszeit und somit die Anisotropie aufgrund der höheren Masse [201]. Diese Beweglichkeit wird durch κ^2 angegeben [148]. Dieser Faktor beeinflusst auch den Försterradius R_0 , siehe Kapitel 2.2.3. Somit ist die FRET-Effizienz auch von der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente zueinander abhängig. Zur Berechnung wurde κ^2 zu einem Wert von 2/3 angenommen. Dies muss für das hier verwendete Design jedoch nicht zu treffen. Durch das in dieser Arbeit gewählte Design wird jedoch eine nahezu konstante Position des

Farbstoffs sichergestellt. Durch den Einsatz der Poly-A Sequenz kann die genaue Position des Akzeptors allerdings nicht exakt bestimmt werden. Möglicherweise befindet sich dieser in manchen Fälle direkt über dem NRO, wodurch unerwünschte Interaktionen zwischen dem π -System des Farbstoffes und den Basen der Nanostruktur auftreten können. Um genauere Informationen bezüglich des Farbstoffes zu erhalten, wurde die Firma **abberior GmbH** kontaktiert. Nach Angaben der **abberior GmbH** sind bisher keine Veröffentlichungen zu einem möglichen zweiten Emissionszustand des Farbstoffs oder anderen einschränkenden Phänomen bekannt. Aufgrund der negativen Ladung des Farbstoffes treten möglicherweise Interaktionen mit dem DNA-Rückgrat auf. Die von Wurm et al [202] publizierte mäßige Stabilität des NHS-Esters hat laut Hersteller keinen Einfluss auf die erhaltene breite Verteilung. Darauf basierend können laut Hersteller nur die Abstoßungskräfte zwischen Farbstoff und DNA den FRET-Wert beeinflussen. Bedingt durch die gewählte Sequenz kann dies durchaus eine Erklärung für die breite Verteilung liefern. Wie bereits erwähnt ist die genaue Position des Akzeptors aufgrund der Poly-A Sequenz nicht exakt zu bestimmen. Der Farbstoff benötigt etwa 2/3 der Nukleotide für eine permanente Bindung. Wird angenommen, dass die Abstoßungskräfte ein Anbinden des Farbstoffes nach sieben Nukleotiden erlauben, kann der Farbstoff auf einer Länge von 2,38 nm frei beweglich sein. Bei der Berechnung der möglichen Abstände wurde berücksichtigt, dass die Farbstoffe bei den Positionen mit und ohne crossover nicht in einer Linie liegen, vergleiche Abbildung 3.3. Daher wurde für die Kalkulation stets der Satz des Pythagoras verwendet. Diese Zusammenhänge sind in der folgenden Abbildung 4.12 illustriert.

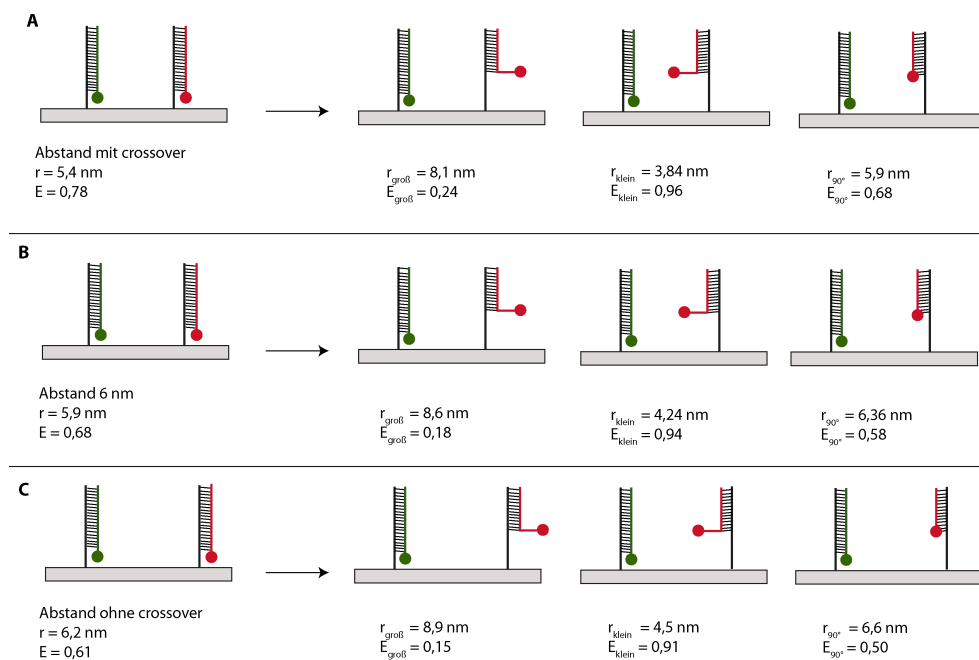


Abbildung 4.12: Mögliche Variabilität des Farbstoffs bedingt durch die Anbindesequenz. Gezeigt sind die drei per Superauflösungsmikroskopie bestimmten Abstände (A-C) sowie der im Idealfall erwartete E-Wert beim jeweiligen Abstand. Bindet der Farbstoff nicht vollständig an die komplementäre Sequenz, kann dieser theoretisch frei um den *docking strand* rotieren. Zur Vereinfachung werden hier nur Abstände und entsprechende E-Werte ermittelt, bei denen der Farbstoff zum Donor, von diesem weg zeigt oder im rechten Winkel zu ihm steht.

Abbildung 4.12 zeigt in den Teilabbildungen A-C die jeweiligen mittels DNA-PAINT vermessenen Abstände sowie der daraus resultierende FRET-Wert, wenn der Farbstoff der Abbildung entsprechend zur Nanostruktur zeigt. Bindet der Farbstoff nicht über die gesamte Länge der komplementären Sequenz, wird er durch die Abstoßungskräfte zwischen DNA-Origami Nanostruktur und Farbstoff zu einem gewissen Grad frei beweglich am *docking strand* verweilen. Die entsprechenden Grenzfälle sind in Abbildung 4.12 gezeigt. Es sei darauf verwiesen, dass aufgrund der Persistenzlänge einzelsträngiger DNA von 1 nm [196] das Auffinden eines rechtwinkligen Biegens in der DNA nicht der Realität entspricht und diese extreme Darstellung lediglich zur Veranschaulichung des Rahmens dient, in dem die freie Bewegung des Farbstoffes statt finden kann. Der Akzeptor kann zum Donor oder von diesem fort zeigen, wodurch ein kleinerer als auch ein größerer Abstand im Vergleich zum supraaufgelösten Wert resultiert. Mittels Formel 2.8 lässt sich der entsprechende *E*-Wert ermitteln. Wird wie in Abbildung 4.12 A der Abstand des vom Donor fort zeigenden Akzeptors über den Satz des Pythagoras bestimmt, ergibt sich eine Distanz von 8,1 nm. Dazu wird die Position des Akzeptors in einer Höhe von 2,38 nm und 7,78 nm entfernt vom Donor angenommen. Nach Formel 2.8 ergibt sich ein *E*-Wert von 0,24. Die in Abbildung 4.12

gezeigten Werte finden sich auch in den Ergebnissen der FRET-Messungen wieder. Durch die unterschiedliche Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleinsäuren dissoziieren A-T reiche Sequenzen leichter als G-C reiche Paarungen [203]. Für die Poly-A Sequenz bedeutet dies, dass sie für eine stabile Helix über mehr als 2/3 der Nukleotide paaren müsste. Andererseits kann die Abstoßung zwischen Farbstoff und DNA so groß sein, dass die Basenpaarungen dissoziieren und die in Abbildung 4.12 illustrierten Ereignisse eintreten. Nichtsdestotrotz sollte das im Puffer befindliche MgCl_2 die negative Ladung des DNA-Rückgrats soweit abschirmen, dass die Bildung der Doppelhelix durch solche Interaktionen nicht gehemmt wird [204].

Gleichzeitig ist es durch die Poly-A Sequenz möglich, dass zwei Farbstoffe an einen *docking strand* gebunden werden. Hinweise darauf geben die in Abbildung 4.10 und 4.11 gezeigten Spuren. Der Donor könnte so seine Energie auf zwei Akzeptormoleküle übertragen, was wiederum zu unterschiedlichen FRET-Werten führen kann.

Letztlich sind nur wenige Intensitätsspuren analysiert worden, die insgesamt FRET zeigten. Dies ist auch auf das *externe Labeling* der DNA-Origami Nanostruktur zurückzuführen. Die Effizienz der erfolgreichen Markierung liegt bei etwa 70 %. Durch das Verhalten des Akzeptors wird die Anzahl an potentiell auswertbaren Spuren weiter reduziert.

Diese genannten Faktoren erlauben zusammengefasst keine quantitative Bestimmung der FRET-Werte. Um die erhaltenen Ergebnisse zu prüfen, sind die auf der Oberfläche gebundenen DNA-Origami Nanostrukturen am etablierten konfokalen Aufbau vermessen worden. Die erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden gezeigt.

4.3.2 Ergebnisse der FRET-Messung von designten Abständen im Bereich von 6 nm am konfokalen Setup auf der Oberfläche

Die am Weitfeld-Aufbau erhaltenen E-Werte verfügen über eine begrenzte Aussagekraft, weshalb die DNA-Origami Nanostrukturen an einem konfokalen Mikroskop wiederholt analysiert worden sind, siehe Kapitel 3.2.1.3. Für die FRET-Experimente wurde die in Kapitel 3.1.2 beschriebene Nanostruktur eingesetzt und entsprechend Kapitel 3.1.6.3 vorbereitet. Die Frequenz der Alternierung lag bei 2 ms. Die verwendeten Leistungen lagen bei jeweils 3 μ W des roten und grünen Lasers, siehe Kapitel 3.2.1.3. Die Auswertung erfolgte nach Kapitel 3.2.1.4.

Die Ergebnisse für die FRET-Messung der DNA-Origami Nanostruktur mit einem Abstand von 5,9 nm zwischen dem crossover sind in folgender Abbildung 4.13 gezeigt.

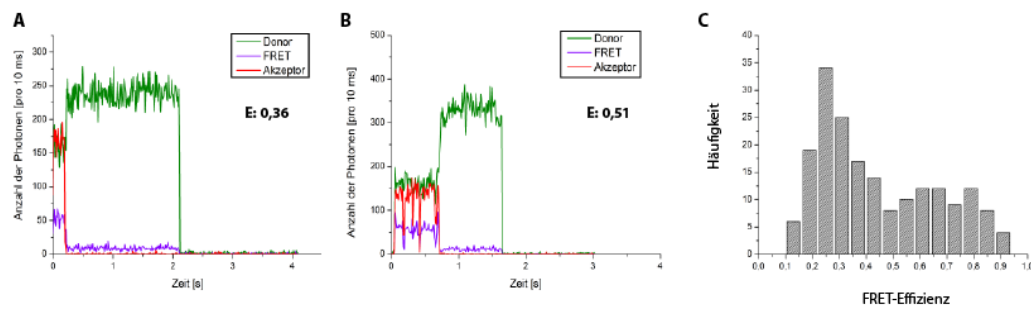


Abbildung 4.13: FRET-Spuren und deren Auswertung für einen Abstand von 5,9 nm mit crossover am konfokalen Setup. A und B: Spur mit den jeweiligen Intensitäten des Donors (grün), des Akzeptors (rot) und der daraus resultierenden FRET-Spur (violett). C: Histogrammierte Häufigkeitsverteilung der E-Werte.

Abbildung 4.13 A und B zeigen Spuren mit unterschiedlichen E-Werten für diesen designten Abstand. Die Fluktuation des Akzeptors ist hier ebenfalls zu beobachten, siehe Abbildung 4.13 B. Sie ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei den Spuren des Weitfelds. Auch hier zeigt sich eine breite Verteilung, die durch mehrere Maxima gekennzeichnet ist. Werden die zwei Erhebungen bei hohen Effizienzen zusammengefasst betrachtet, ergeben sich optisch insgesamt zwei Maxima. Deren Zentren befinden sich für den *low FRET* bei $\sim 0,3$ und für den *high FRET* bei $\sim 0,75$. Dieser Wert entspricht rückführend nach Gleichung 2.8 einem Abstand von 5,6 nm. Dieser weicht nur geringfügig vom supraaufgelösten Abstand an dieser Position ab und bekräftigt die gemessene Verzerrung der Abstände in Abhängigkeit der crossover. Eine eindeutige Näherung ist aufgrund der breiten Verteilung an Messwerten jedoch nicht angebracht.

In Abbildung 4.14 sind beispielhaft erhaltene Spuren sowie die Verteilung an E-Werten für den designten Abstand von 6 nm gezeigt.

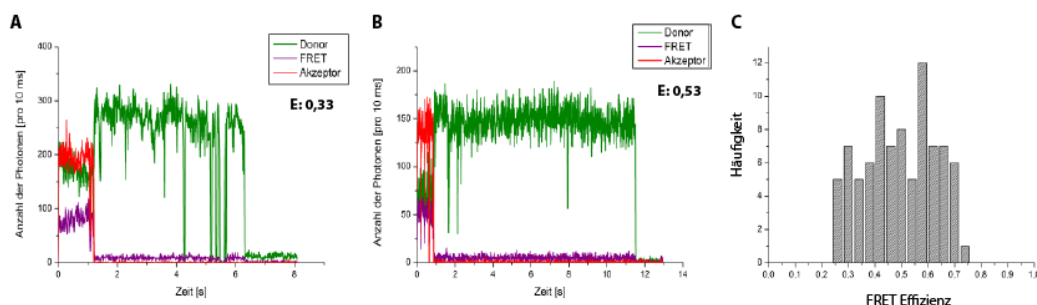


Abbildung 4.14: FRET-Spuren und deren Auswertung für einen Abstand von 6 nm am konfokalen Setup. A und B: Spur mit den jeweiligen Intensitäten des Donors, des Akzeptors und der FRET-Spur. C: Histogrammierte Häufigkeitsverteilung der E-Werte.

Die Abbildungen 4.14 A und B zeigen erneut unterschiedliche Populationen von E-Werten für diesen designten Abstand. Die in Abbildung 4.14 C gezeigte breite Verteilung liefert keine quantitativ auswertbaren Ergebnisse.

Die Ergebnisse für den designten Abstand von 5,9 nm ohne crossover sind in Abbildung 4.15 gezeigt.

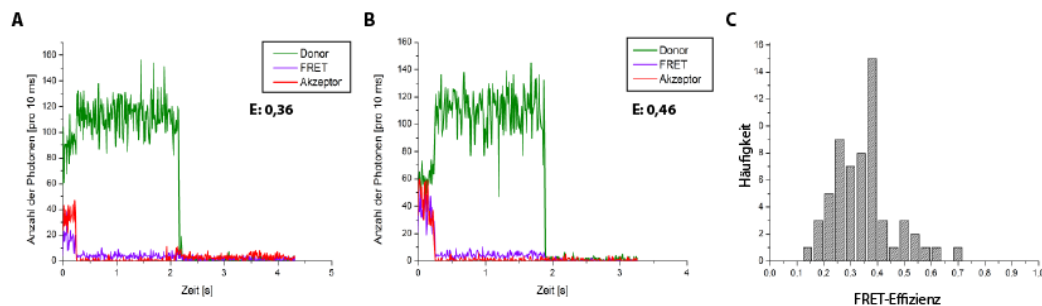


Abbildung 4.15: FRET-Spuren und deren Auswertung für einen Abstand von 5,9 nm ohne crossover am konfokalen Setup. A und B: Spur mit den jeweiligen Intensitäten des Donors (grün), des Akzeptors (rot) und der daraus resultierenden FRET-Spur (violett). C: Histogrammierte Häufigkeitsverteilung der E-Werte.

Abbildungen 4.15 A und B zeigen Spuren mit einer Emissionsdauer des Akzeptors von weniger als 0,5 Sekunden und unterschiedlichen E-Werten für diesen designten Abstand. Die in Abbildung 4.15 C gezeigte Verteilung lässt erneut keine eindeutige Bestimmung quantitativer Werte zu.

Die Daten des konfokalen Aufbaus lassen aufgrund der breiten Verteilungen keine eindeutige quantitative Auswertung zu. Im Vergleich zum Weitfeld konnten feinere Spuren mit geringer ausgeprägten Fluktuationen generiert werden. Dennoch wird der Akzeptor wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben durch verschiedene Faktoren wie beispielsweise photoinduzierte Reaktionen und dadurch bedingte Zustandsänderungen nachteilig beeinflusst.

Um die Ausbeute an Daten für das FRET-Paar aus *Abberior STAR RED* und *ATTO[®]542* zu erhöhen, sind die Nanostrukturen in Lösung vermessen worden. Dazu wurden die Parameter nach Kapitel 3.2.2.1 gewählt. Die Ergebnisse der Lösungsmessung sind im folgenden Kapitel 4.3.3 gezeigt.

4.3.3 Ergebnisse der FRET-Messung in Lösung

Um eine Beurteilung der Abstände auf Basis der FRET-Werte durchführen zu können, werden im Folgenden die Daten der Lösungsmessungen des Konfokal-Aufbaus mit dem FRET-Paar *Abberior STAR RED* und *ATTO[®]542* betrachtet ¹. Die erhaltenen Rohdaten können zunächst in einem S über E-Diagramm dargestellt werden. Exemplarisch ist dies in folgender Abbildung 4.16 für den Abstand von 6 nm gezeigt.

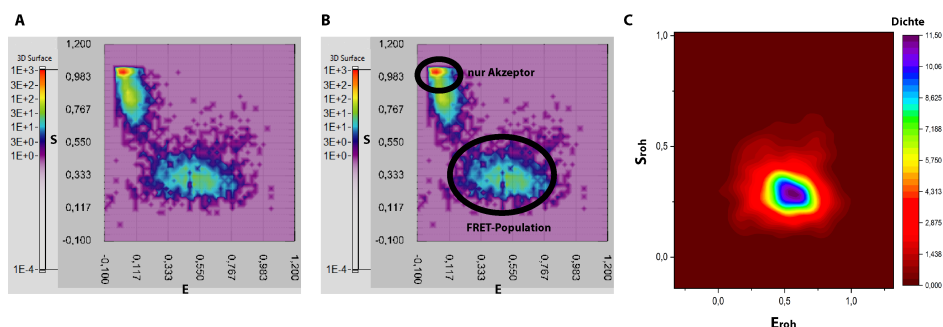


Abbildung 4.16: E-S-Diagramm der Lösungsmessung für einen Abstand von 6 nm. A: Die Intensitäten aus dem Stöchiometriefaktor S sind gegen die FRET-Effizienz E aufgetragen. B: Beschriftung der auffälligen Populationen innerhalb der Rohdaten. C: Für die weitere Auswertung ist lediglich die FRET-Population betrachtet und als Kerndichtediagramm abgebildet worden.

Abbildung 4.16 illustriert die Rohdaten der Lösungsmessung für den Abstand des FRET-Paares von 6 nm. Aufgetragen sind dabei die erhaltenen S- über die E-Werte ¹. Auffällig ist die fehlende sonst übliche Anpassung auf den Stöchiometriefaktor S von 0,5 (Abbildung 4.16 A-C). Diese ist nicht zwingend notwendig, da die späteren Korrekturen zu einer Angleichung führen [188]. Abbildung 4.16 B verdeutlicht die in den Rohdaten auftauchenden verschiedenen Populationen. Eine minimale Lücke im Bereich E=0,5 der FRET-Population suggeriert das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Zuständen aus denen der Akzeptor

¹Die Auswertung wurde in diesem Fall von Dr. Andres Vera Gomez durchgeführt

emittiert. Stark auffällig ist hingegen die Population von Molekülen in einem Bereich, der das alleinige Vorhanden sein des Akzeptors indiziert, siehe Abbildung 4.16 B oben. Dieses Phänomen konnte bei allen weiteren untersuchten DNA-Origami Nanostrukturen beobachtet werden. Diese zusätzliche Population impliziert, dass an den Strukturen nur der Akzeptor-Farbstoff gebunden hat oder der Donor bereits geblichen ist. Für die weitere Auswertung sind die Datenpunkte in diesem Bereich nicht berücksichtigt worden. Dies ist in Abbildung 4.16 C durch ein Kerndichtediagramm gezeigt. Neben der Struktur mit dem designten Abstand von 6 nm sind ebenfalls die DNA-Origami Nanostrukturen mit den theoretischen Abständen von 5,9 nm untersucht worden. Abbildung 4.17 zeigt schematisch die verwendeten Nanostrukturen.

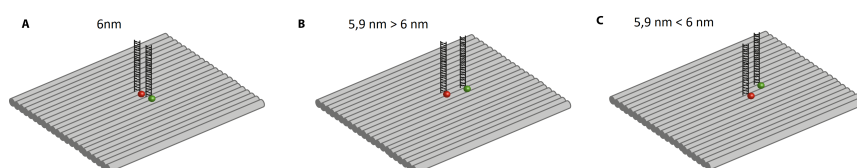


Abbildung 4.17: Schematische Darstellung der DNA-Origami Nanostrukturen mit extern angebundenem FRET-Paar. A-C: Das Farbstoffpaar wird jeweils als modifizierter Strang nach der Hybridisierung zugeben. Dabei wird jede Nanostruktur entsprechend hergestellt.

Die in Abbildung 4.17 A-C gezeigten Schemata der in Lösung vermessenen Nanostrukturen zeigen die Position extern angegebener Farbstoffe für die drei verschiedenen Abstände. Abbildung 4.17 B zeigt den Abstand zwischen den Fluorophoren, die auf die durch ein crossover verbundenen Helices gebunden wurden. Hierbei wird einer kleinerer Abstand als die theoretischen 5,9 nm erwartet. Bei dem FRET-Paar aus Abbildung 4.17 C hingegen befindet sich kein crossover dazwischen, die DNA-Helices sind hier weiter voneinander entfernt, sodass eine niedrigere Energieübertragungseffizienz erwartet wird. Alle Proben sind unter identischen Bedingungen vermessen worden. Im Folgenden sind die Histogramme der korrigierten FRET-Effizienzen gezeigt.

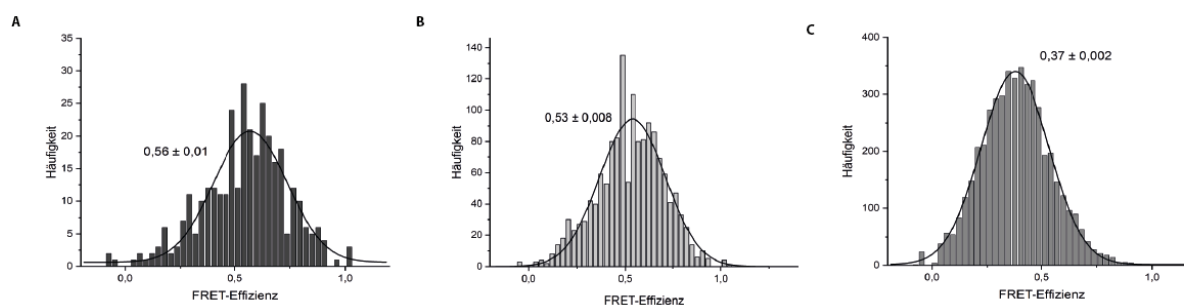


Abbildung 4.18: FRET-Effizienzen der Lösungsmessung für Abstände im Bereich von 6 nm. Die Histogramme zeigen die korrigierten FRET-Effizienzen der unterschiedlich designten Abstände.

Die in Abbildung 4.18 A und C gezeigten Häufigkeitsverteilungen zeigen die jeweiligen korrigierten FRET-Effizienzen. Die hier gezeigten Histogramme sind mit aufsteigendem Abstand abgebildet. Durch den crossover zwischen den Helices, die die DNA-Stränge verbinden, wird das Farbstoffpaar näher zueinander gezogen, wodurch ein höherer E-Wert gemessen wird. Das dazu gezeigte Histogramm zeigt vergleichsweise wenige Datenpunkte sowie eine breite, unstete Verteilung. Ohne den crossover zwischen den Helices ist die FRET-Effizienz deutlich kleiner, woraus ein größerer Abstand resultiert. In Abbildung 4.18 B, welche die FRET-Effizienz für den Abstand von 6 nm zeigt, spiegelt sich auch ein in den Rohdaten bereits gezeigte zweite mögliche Population. Durch die zentrale Lage aller gewählten *docking strands* ist die Vermessung von zu kleinen Abständen aufgrund struktureller Deformation der theoretischen DNA-Origami Nanostruktur (Torsion) nicht zu erwarten [49] [71]. Wahrscheinlicher ist die in Kapitel 4.2 bereits diskutierte Verzerrung der Abstände aufgrund der helikalen Verknüpfung zwischen den DNA-Strängen. Zur direkten Korrelation sind die Abstände der FRET- und DNA-PAINT-Messung gegeneinander aufgetragen, siehe folgenden Abbildung 4.19. Um hier die Generierung von Abständen aus der gemessenen FRET-Effizienz durchzuführen, ist Formel 2.8 entsprechend umgestellt worden, siehe Kapitel 2.2.3.

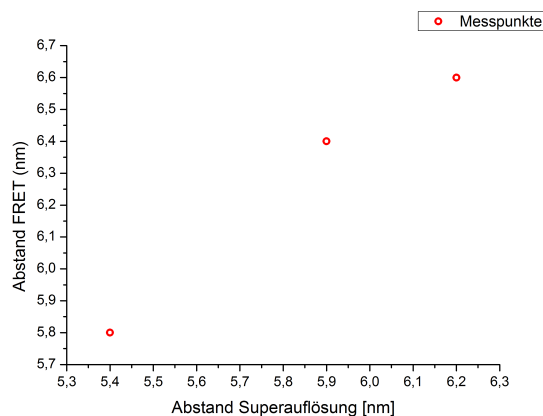


Abbildung 4.19: Zusammenhang der gemessenen Abstände aus FRET und Superauflösung. Die aus den gemessenen FRET-Effizienzen berechneten Abstände sind gegen die gemessenen Abstände der Superauflösung aufgetragen.

Abbildung 4.19 zeigt die gegeneinander aufgetragenen Abstände der FRET- und DNA-PAINT-Messungen. Zur Generierung von Abständen aus der gemessenen FRET-Effizienz ist wie bereits erwähnten Formel 2.8 entsprechend umgestellt worden, siehe Kapitel 2.2.3. Hierbei wird deutlich, dass die Abstände der FRET-Experimente zu größeren Werten verschoben sind. Des Weiteren zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem Abstand mit crossover und den übrigen Abständen. Während sich die zwei weiteren Abstände lediglich um 0,3 nm unterscheiden, ist hier eine Diskrepanz von 0,6 nm beobachtet worden. Diese Differenzen sind nahezu identisch mit denen der Superauflösung. Somit bestätigen

auch die FRET-Experimente eine Verzerrung der Abstände auf dem NRO. Bedingt durch den crossover werden die Helices näher zueinander gezogen, wodurch ein kleinerer Abstand gemessen wird. Die Abstände der FRET-Experimente zeigen diesbezüglich die gleiche Tendenz wie die Abstände der Superauflösung.

Die Verschiebung zu größeren FRET-Effizienzen ist allein durch die Verzerrung der DNA durch die crossover nicht zu erklären. Die Nanostrukturen sind für diese Experimente in Lösung untersucht worden, was in einer zusätzlichen Flexibilität resultieren kann. Zu beachten sind dabei die acht Nukleotide langen DNA-Einzelstrangregionen neben den Biotin-Modifikationen, siehe Kapitel 3.1.2. Durch die Kürzung der Biotinstränge liegt ein 2,72 nm langer Bereich des *Scaffold* als Einzelstrang vor. Bedingt durch eine Persistenzlänge von 1 nm kann dieser Teil nicht mehr als stabartig gesehen werden. Aufgrund der fehlenden Stabilität können sich die benachbarten Farbstoff annähern, sich dadurch gegenseitig beeinflussen und eine Fluktuation der Fluoreszenz verursachen [205]. Ebenso können auch die Linker zwischen DNA und Farbstoffmolekül zu einer Abweichung führen. Durch dieses Molekül wird ein zusätzlicher Abstand generiert, der sich wiederum in den FRET-Effizienzen widerspiegeln kann. Viele Hersteller nutzen vergleichsweise lange Moleküle (1,2 nm bis 2,1 nm), die wiederum zusätzlich in die gemessene Energieübertragung und letztlich in den Abstand einfließen. Besonders bei kurzen Abständen zwischen den Farbstoffmolekülen können die langen Linker dazu führen, dass sich die Farbstoffe soweit annähern, dass sie sich in der Fluoreszenzemission beeinflussen und diese unterdrücken [206]. Die Länge der Linker fließt somit ebenfalls zu einem gewissen Teil in die Abstandsbestimmung ein. Zur besseren Übersicht sind die erhaltenen Ergebnisse in der folgenden Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Vergleich der Superauflösungs- und FRET-Abstände

theoretischer Abstand r [nm]	5,9 mit crossover	6	5,9 ohne crossover
Superauflösung [nm]	5,4	5,9	6,2
FRET [nm]	5,8	6,4	6,6
Abweichung Abstand Superauflösung & FRET			
[nm]	0,4	0,5	0,4
[%]	7	8	7

Tabelle 4.1 veranschaulicht die in den Abbildungen 4.18 und 4.19 gezeigten Ergebnisse. Sowohl die Abstände der DNA-PAINT-Superauflösung als auch die Abstände der FRET-Messungen weichen von den theoretischen Werten ab. Grund dafür ist das in Kapitel 4.2 bereits gezeigte Design der verwendeten DNA-Origami Nanostruktur. Durch die crossover, die die einzelnen DNA-Stränge verknüpfen, entsteht eine Rautenstruktur, wodurch die jeweilige Position des gewählten *docking strands* verändert wird.

Die bereits erwähnte Verringerung der Stabilität bedingt durch das Betrachten der Nanostrukturen in Lösung ist mit im Schnitt 7,3 % vergleichsweise gering. Trotz der guten Übereinstimmung mit den Abständen, die mittels DNA-PAINT vermessen wurden, sind die vorgestellten Ergebnisse zu hinterfragen. Das externe Anbinden führt zu einer geringen Anzahl an zu untersuchenden Strukturen und der *Abberior STAR RED* bedarf aufgrund seines spektralen Verhaltens einer deutlich komplexeren Zusammensetzung des Messpuffers, weshalb er sich für die hier durchgeführten Messungen nicht eignet. Ein anderer, etablierter Akzeptorfarbstoff ist für die Durchführung zukünftiger Experimente zu wählen.

Um letztlich eine verlässliche, quantitative Auswertung durch zu führen und absolute FRET-Effizienzen zu generieren, sind DNA-Origami Nanostrukturen in Lösung vermessen worden, bei denen beide Farbstoffmoleküle fest verankert waren. Dies erhöht sowohl die Labelingeffizienz und kann zusätzliche Informationen über das Entstehen der breiten FRET-Verteilungen geben. Des weiteren ist hierfür der *Abberior STAR RED* durch den für FRET-Experimente etablierten Farbstoff *ATTO[®]647N* ersetzt worden, um die in dieser Arbeit angestrebte Rückführbarkeit der E-Werte auf den Abstand der Superauflösungsmikroskopie zu zeigen.

4.3.4 Vermessung der DNA-Origami Nanostruktur mit internen Farbstoffen in Lösung

Wie bereits in Kapitel 4.3.1 angedeutet, kann das gewählte Design der DNA-Origami Nanostruktur und die als *docking strand* gewählte Poly T Sequenz möglicherweise die breite Verteilung der FRET-Werte bedingen. Um dies auszuschließen, sind der Donor- und Akzeptorfarbstoff in der Nanostruktur verankert worden. Dazu wurden an der unmodifizierten Sequenz lediglich zwei Thyminnukleotide angefügt und die Farbstoffe am 3'-Ende gebunden. Die verwendeten Sequenzen finden sich im Anhang A.2. Durch die relativ konstante Position der Farbstoffe kann die in Kapitel 4.3 angedeutete freie Rotation durch nicht hybridisierte DNA-Abschnitte untersucht werden. Die schematische Darstellung dieser Nanostrukturen ist in folgender Abbildung 4.20 gezeigt.

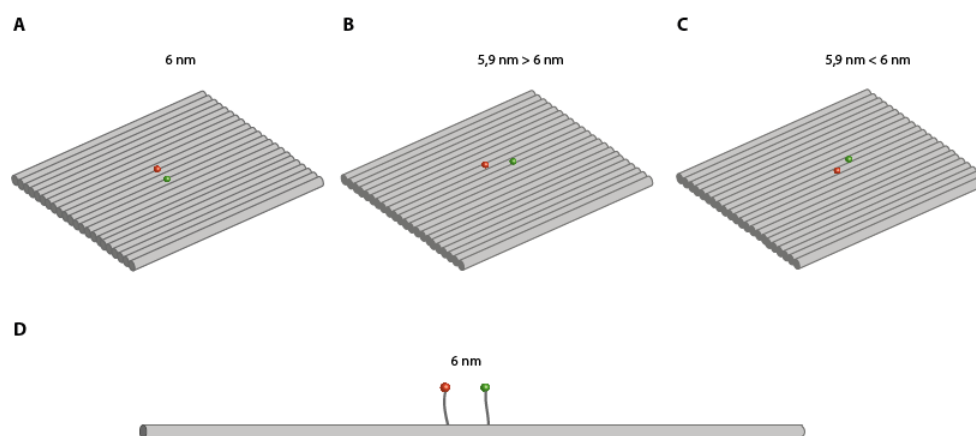


Abbildung 4.20: Schematische Darstellung der DNA-Origami Nanostrukturen mit fest integriertem FRET-Paar. A-C: Das Farbstoffpaar wird jeweils als modifizierter *staple strand* bei der Hybridisierung zugeben und während der Faltung in die Nanostruktur integriert. Dabei wird jede Nanostruktur entsprechend hergestellt. D: Das FRET-Paar aus *ATTO*[®]542 und *ATTO*[®]647N ragt bedingt durch die zwei Thymin-Spacer 0,68 nm aus der Nanostruktur. Der Farbstoff kann frei rotieren, sich aber nicht von seiner Ausgangsposition entfernen. Der Abstand der Farbstoffe zu einander beträgt theoretisch 6 nm.

Abbildung 4.20 zeigt die jeweils für die Lösungsmessung verwendeten DNA-Origami Nanostrukturen mit dem nun verwendeten und etablierten FRET-Akzeptor *ATTO*[®]647N [50] [173] [174] [175]. Die entsprechenden Resultate der Lösungsmessung sind im Folgenden gezeigt.

Um die in dieser Arbeit angestrebte Rückführbarkeit der E-Werte auf den Abstand der Superauflösungsmikroskopie zu zeigen, ist der *Abberior STAR RED* für das folgende Experiment durch den *ATTO*[®]647N ersetzt worden.

Die hier untersuchten Nanostrukturen entsprechen den in Kapitel 3.1.2 beschriebenen. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Lösungsmessung einer Nanostruktur mit integrierten Farbstoffen gezeigt. Die Leistung der jeweiligen Laser ist so gewählt worden, dass der Stöchiometriefaktor S bei 0,5 liegt. Dies wurde erreicht, indem die Leistung des grünen Lasers erhöht beziehungsweise die Leistung des roten Lasers reduziert wurde. Die verwendeten Leistungen lagen bei $27\text{ }\mu\text{W}$ des roten und $15\text{ }\mu\text{W}$ des grünen Lasers. Die Frequenz der Alternierung lag bei 100 ms. Die Nanostrukturen, die durch den Fokus diffundieren, werden im Vergleich zu den Oberflächenmessungen mit geringerer Laserleistung bestrahlt, sodass photoinduzierte Prozesse vermieden werden können.

Neben den eigentlichen Proben werden zur Bestimmung der Umgebungskorrekturen zusätzlich der Messpuffer sowie Nanostrukturen untersucht, die jeweils nur einen Farbstoff tragen. Außerdem wurden drei maßgeschneiderte Proben der Firma GATTAQUANT GmbH vermessen, um die Linearität der Detektoren zu prüfen und als Referenz zur Bestimmung der Korrekturfaktoren zu dienen. Bei diesen Sonderanfertigungen wurde das FRET-Paar in Abständen von 5,1 nm, 5,5 nm und 10 nm zueinander auf dem NRO positioniert. Dabei sind FRET-Effizienzen von $E=0,83$, $E=0,76$ und $E=0,08$ zu erwarten. Diese Referenzen sind unter identischen Bedingungen vermessen worden. Die erhaltenen Rohdaten der jeweiligen Referenzen sind in folgender Abbildung 4.21 in einem Kerndichtediagramm dargestellt.

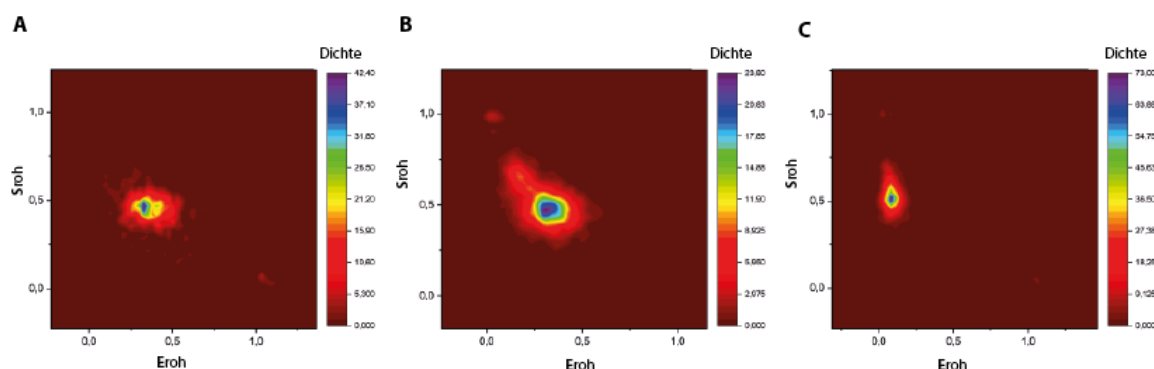


Abbildung 4.21: Kerndichtediagramm der FRET-Effizienz der GATTAQUANT GmbH Proben. A-C: Die FRET-Populationen für die designten Abstände zur Bestimmung der γ -Korrektur.

Abbildung 4.21 zeigt die Kerndichtediagramme der einzelnen Sonderanfertigungen mit aufsteigendem Abstand. Die FRET-Effizienz gegenüber dem Stöchiometriefaktor S in Abbildung 4.21 A zeigt einen Wert von etwa $E=0,3$. Dies entspricht einer Abweichung von über 60 %. Ähnlich große Abweichungen sind für die weiteren Referenzen zu beobachten. Für die Referenz des kleinsten Abstands von 5,1 nm ist eine leicht isolierte Population rechts neben der Hauptpopulation zu erkennen. Ähnliches ist ebenfalls in Abbildung 4.21 B zu sehen. Hier ist eine stärker ausgeprägte Häufung von Effizienzen links oberhalb der eigentlichen FRET-Verteilung detektiert worden.

Die gezeigten Rohdaten sind anschließend nach den Angaben in Kapitel 3.2.2.2 um den Hintergrund, die *direct excitation*, *cross talk* als auch die Faktoren γ und β korrigiert worden. Die zur Bestimmung letztgenannter Faktoren verwendete Gerade und die daraus abgeleitete Geradengleichung findet sich im Anhang, siehe A.6. Die so erhaltenen absoluten FRET-Effizienzen sind hinsichtlich ihrer Häufigkeit gezählt und in ein Histogramm übertragen worden, welches anschließend mit einer Gauß-Funktion angenähert wurde. Die entsprechenden Histogramme sind in Abbildung 4.22 gezeigt.

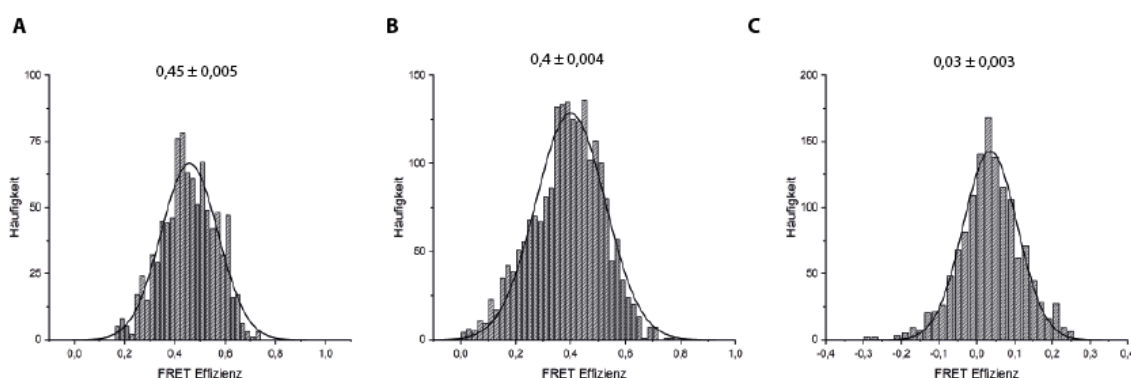


Abbildung 4.22: Histogramme der FRET-Effizienz der GATTAQUANT GmbH Proben. A-C: Die Histogramme zeigen die korrigierten FRET-Effizienzen der unterschiedlich designten Abstände.

In Abbildung 4.22 sind die Häufigkeitsverteilungen der Referenzproben der GATTAQUANT GmbH mit aufsteigendem Abstand gezeigt. Besonders die Verteilungen der kleinen Abstände von 5,1 nm und 5,5 nm sind vergleichsweise breit. FRET-Effizienzen, die beispielsweise durch Konformationsänderungen einer RNA-Polymerase erfasst werden, die an einem DNA-Doppelstrang gehalten wird, fallen wesentlich schärfer und spezifischer aus [152]. Die in Abbildung 4.21 B erfasste Häufung an E-Werten links oberhalb der Population spiegelt sich in einer leichten Verbreiterung im entsprechenden Histogramm wieder. Ein engerer Rahmen für die Auswahl an betrachteten Daten kann die Verteilungsbreite der Energieübertragungseffizienz zwar reduzieren, liefert weder eine Erklärung für besagte zusätzliche Anhäufung an Datenpunkten noch für die generelle Abweichung von den theoretisch erwarteten, deutlich höheren FRET-Effizienzen. Für die Referenz des Abstands 5,1 nm zeigt sich diesbezüglich eine Abweichung von 45 %. Die Erfassung von abweichenden FRET-Werten wurde bereits in den Kapiteln 4.3.1 bis 4.3.3 beschrieben. Hierbei fiel die Abweichung mit unter 10 % vergleichsweise gering aus. Der Einsatz von intern in der DNA-Origami Nanostruktur abgebrachten Farbstoffen erhöht die Ausbeute an zu untersuchenden Strukturen zu Lasten der Übereinstimmung mit dem Erwartungswert. Folgende Tabelle 4.2 stellt die Erwartungs- und Messwerte der GATTAQUANT GmbH Proben gegenüber.

Tabelle 4.2: Vergleich der Referenzabstände

theoretischer Abstand r [nm]	theoretischer E-Wert
5,1	0,83
5,5	0,76
10	0,08
berechneter Abstand r [nm]	gemessener E-Wert
6,9	0,45
7,2	0,4
11,9	0,03

Die absoluten FRET-Effizienzen lassen sich durch Umformung der Gleichung 2.8 in Abstände überführen. Daraus resultiert, dass die Messwerte in Schnitt einen 1,8 nm größeren Abstand zeigen als theoretisch erwartet wurde.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Abstandsproben im Bereich von 6 nm gezeigt. Zunächst vorgestellt werden die Rohdaten, die einen ersten Eindruck über die Messergebnisse erlauben. Diese Rohdaten werden wie oben erwähnt nach den Angaben in Kapitel 3.2.2.2 ausgewertet und korrigiert, um die absolute FRET-Effizienz zu erhalten. Aus dieser lässt sich abschließend der Abstand für die jeweils untersuchte Probe berechnen. Die erhaltenen Rohdaten der jeweiligen Proben sind in folgender Abbildung 4.23 in einem Kerndichtediagramm dargestellt.

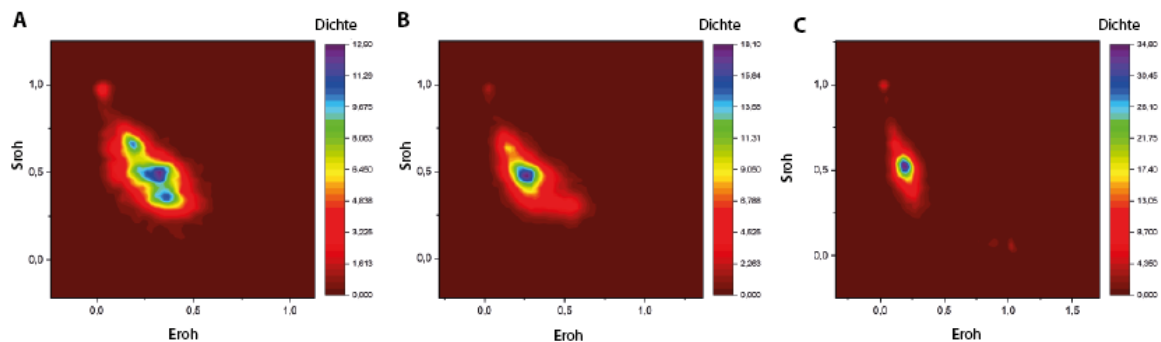


Abbildung 4.23: Kerndichtediagramm der FRET-Effizienz der Abstandsproben. A-C: Die FRET-Populationen für die designten Abstände in einem Bereich von 6 nm.

Die in Abbildung 4.23 A-C gezeigten Kerndichtediagramme geben die Rohdaten der in Lösung gemessenen DNA-Origami Nanostrukturen mit Abständen im Bereich von 6 nm wieder. Wie bei den Referenzproben der GATTAQUANT GmbH sind diese ebenfalls mit aufsteigendem Abstand dargestellt. Auch hier ist eine Abweichung von den erwarteten FRET-Effizienzen festzustellen. Beispielhaft zeigt Abbildung 4.23 B eine FRET-Effizienz gegenüber dem Stöchiometriefaktor S von etwa $E=0,3$. Dies entspricht einer Abweichung

von über 50 %, da für den Abstand von 6 nm eine theoretische Übertragungseffizienz von 0,65 bestimmt wurde. Ähnlich große Abweichungen sind auch für die weiteren Proben zu beobachten. Des weiteren sticht besonders die Kerndichte der Population in Abbildung 4.23 A hervor. Neben der Population im Bereich des eingestellten Stöchiometriefaktors $S=0,5$ finden sich zwei weitere deutlich erkennbare Populationen über ($S=0,65$) und unterhalb ($S=0,3$) der idealen Stöchiometrie. Ein Stöchiometriefaktor größer 0,5 impliziert, dass vermehrt das Akzeptormolekül vorliegt. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 4.23 B ähnlich der **GATTAQUANT GmbH** Referenz für den mittleren Abstand von designten 5,5 nm eine ausgeprägte Datendetektion bei einem höheren Stöchiometriefaktor. Zu beachten ist hier, dass für die Synthese der Referenzproben der **GATTAQUANT GmbH** andere Positionen im NRO gewählt wurden.

Die Rohdaten sind anschließend nach den Angaben aus Kapitel 3.2.2.2 korrigiert worden. Die mittels Gaußfit angenäherten Histogramme der FRET-Effizienz sind in folgender Abbildung 4.24 gezeigt.

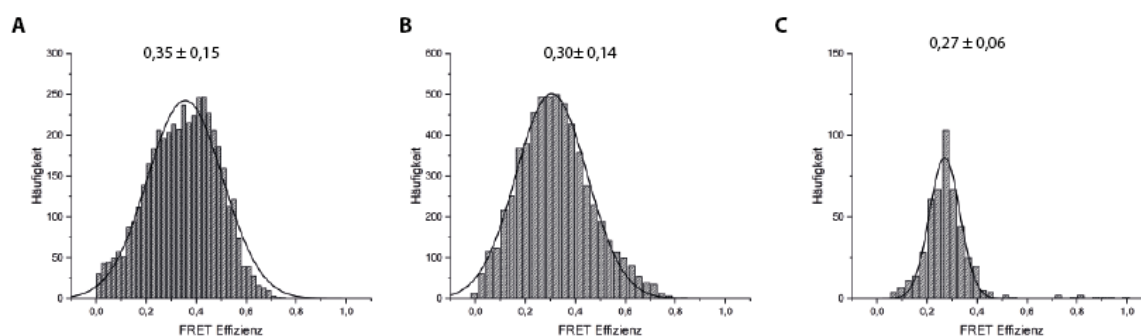


Abbildung 4.24: Histogramme der FRET-Effizienz der Abstandsproben. A-C: Die Histogramme zeigen die korrigierten FRET-Effizienzen der unterschiedlich designten Abstände auf der rechteckigen DNA-Origami Nanostruktur.

Die hier gezeigten Histogramme sind wie zuvor mit aufsteigendem Abstand abgebildet. Erneut sind die Verteilungen der kleineren Abstände wesentlich breiter, siehe Abbildung 4.24 A und B, was durch die zusätzlichen Datenpunkte ober- und unterhalb der Hauptpopulation bedingt ist. Deren Breite wird wie bereits genannt durch die zusätzliche Häufung an E-Werten bei abweichenden Stöchiometriefaktoren generiert. Engere Rahmen für die Datenbetrachtung reduziert die Breite der Verteilung, jedoch begründet dies nicht die auch hier festzustellende generelle Abweichung von den theoretisch erwarteten FRET-Effizienzen. Hier sind wie bei den Referenzproben der **GATTAQUANT GmbH** kleinere Effizienzen als erwartet vermessen worden, die wiederum in einem größeren Abstand resultieren. Auch hier impliziert der Einsatz von intern in der DNA-Origami Nanostruktur abgebrachten Farbstoffen eine höhere Ausbeute an zu untersuchenden Strukturen zu Lasten der Übereinstimmung mit dem Erwartungswert. Eine Übersicht der theoretischen Abstände sowie dazu korrelierten

Energieübertragungseffizienzen ist in folgender Tabelle 4.3 gegeben.

Tabelle 4.3: Vergleich der Probenabstände

theoretischer Abstand r [nm]	5,9 mit crossover	6	5,9 ohne crossover
theoretischer E-Wert	0,68	0,65	0,68
gemessener E-Wert	0,35	0,30	0,27
FRET [nm]	7,39	7,67	7,89
Superauflösung [nm]	5,4	5,9	6,2
Abweichung Abstand Superauflösung & FRET			
[nm]	1,99	1,77	1,69
[%]	27	23	21

Tabelle 4.3 verdeutlicht, dass die aus den korrigierten E-Werten berechneten Abstände im Mittel 1,7 nm größer sind als die theoretisch bestimmte Differenz zwischen Donor und Akzeptor. Die Korrelation der Abstände, die mittels FRET gemessen wurden, zu den Abständen der DNA-PAINT Messungen ist in Rahmen dieser Arbeit der essentielle Aspekt. Veranschaulicht wird dies in folgender Abbildung 4.25, in der die Abstände beider Messmethoden gegeneinander aufgetragen sind.

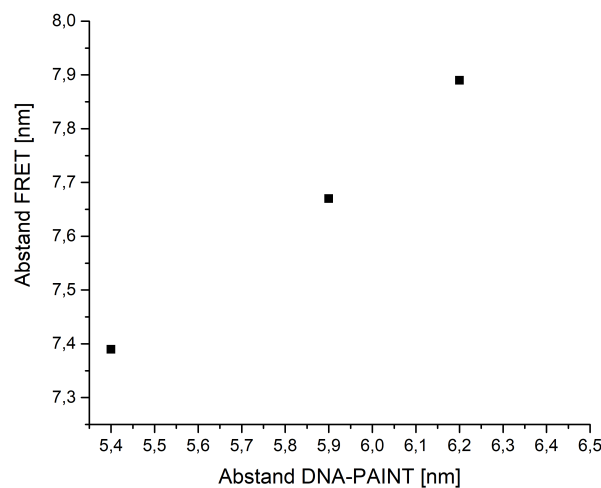


Abbildung 4.25: Auftragung des berechneten FRET-Abstandes gegen den gemessenen DNA-PAINT-Abstands.

Abbildung 4.25 visualisiert den in obiger Tabelle 4.3 beschriebenen Zusammenhang der FRET und DNA-PAINT-Abstände. Deutlich zeigt sich ein linearer Anstieg der jeweiligen Abstände entsprechend des jeweilig gewählten Designs auf dem DNA-Origami. Wie in Kapitel 4.2 bereits gezeigt wurde, erfahren die Strukturen durch das Vorhandensein von

interhelikalen Verbindungen eine Verzerrung der theoretischen Abstände, sodass für eine Probe jeweils ein größerer und ein kleinerer Abstand vermessen wurde. Die Position der Farbstoffe wird besonders zwischen dem crossover verändert. Hier ist die markanteste Abweichung hin zu einem kleineren Wert zu beobachten. Im Gegensatz zu den DNA-PAINT-Abständen weichen die FRET um mehr als 1 nm von diesen ab, was nicht mehr durch die Verzerrung der DNA-Helix zu begründen ist.

Als primäre Ursache, die für den vergrößerten Abstand und somit den kleineren E-Wert herangezogen werden kann, sind die Linker oder die Thyminbasen zu identifizieren. Selbst fest am DNA-Origami gebundene Farbstoffe können nicht als statische Objekte verstanden werden, sondern sind durch die benötigten Linker immer noch flexible Moleküle [207]. Dadurch wird der Abstand zwischen den Molekülen als zu klein angenommen und die unterschlagene Länge spiegelt sich in einem abweichenden FRET-Wert wieder. Des Weiteren bedürfen die zusätzlich identifizierten Populationen, die sich besonders bei kleinen Abständen zeigen, einer Erklärung. Fiori et al [205] konnten diesbezüglich zeigen, dass verstärkt Fluktuationen in der Akzeptorintensität von *ATTO*[®]647N auftauchen, je näher dieser dem Donormolekül ist. Dieses Phänomen ist nicht auf DNA-PAINT übertragbar, da hier sequentiell Moleküle analysiert werden. Durch die beiden Thyminbasen als Abstandshalter zum NRO als auch die Linker, die die Farbstoffe an die DNA koppeln, sind beide Moleküle näher beieinander als 6 nm. Somit kann der Akzeptor teilweise in seiner Emission gestört werden. Wird diese Beobachtung auf die hier gezeigten Daten übertragen, ist die breite Verteilung FRET-Werte dadurch durchaus zu erklären. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass alle Farbstoffe und *docking strands* zwischen zwei Biotin-modifizierten Strängen positioniert sind. Diese sind um acht Basen verkürzt, damit sie zur Unterseite des NRO ragen. Dadurch liegt der Gerüststrang auf einer Länge von 2,72 nm als Einzelstrang vor, siehe Kapitel 3.1.2. Aufgrund der überschrittenen Persistenzlänge ist dieser Teilabschnitt nicht mehr als stabartig zu betrachten. Obwohl das NRO als fester Rahmen betrachtet werden kann, auf dem mittlerweile die Rückführung von supraaufgelösten Abständen zwischen Fluoreszenzmarkern auf die SI-Einheit Meter möglich ist [71], kann die einzelsträngige DNA hier dazu führen, dass der benachbarte Farbstoff aufgrund fehlender Stabilität beeinflusst wird, sich die Farbstoffe annähern und die in [205] beschriebene Fluktuation der Fluoreszenz verursachen. Durch die Vermessung der Strukturen in Lösung geht ein gewisser Grad an Steifigkeit im Vergleich zu Messungen auf der Oberfläche verloren. Erhebliche Verformungen wie in [49] gezeigt, sind bei Verwendung adäquater Salzkonzentration nicht zu erwarten. Die Wahl einer anderen Position der Moleküle entfernt von einzelsträngigen DNA-Sequenzen oder die Verlängerung entsprechender Stränge kann diese Steifigkeit der Nanostruktur wiederherstellen. Für die genutzten Referenzproben wurden Positionen im NRO gewählt, die nur von doppelsträngiger DNA umgeben waren, siehe Anhang A.8. Hier zeigten sich beim kleinsten untersuchten Abstand keine zusätzlichen Populationen, sondern lediglich

die durch die Linker und Thyminbasen bedingte Abweichung vom Erwartungswert.

4.4 Zusammenfassung der DNA-PAINT und FRET-Ergebnisse

In dieser Sektion werden die erhaltenen Ergebnisse der DNA-PAINT und FRET-Experimente zur besseren Vergleichbarkeit zusammengefasst dargestellt.

Die jeweiligen Experimente wurden an DNA-Origami Nanostrukturen durchgeführt, in die *docking strands* bei verschiedenen Abständen integriert wurden. Die entsprechenden theoretischen Abstände lagen bei 5,9 nm mit und ohne crossover sowie bei einem Abstand von 6 nm. Die jeweiligen DNA-Origamis wurden für jeden Abstand und für jede Messmethode separat hergestellt. Um die jeweilige Messmethode zu realisieren und den gleichen Messaufbau für die Messungen zu etablieren, wurden die DNA-Origamis mit unterschiedlich langen *docking strands* hergestellt. DNA-PAINT basiert auf dem kurzzeitigen An- und Abbinden komplementärer Imager, das durch kurze Sequenzen (10 Nukleotide) ermöglicht wird. Für FRET-Messungen waren die Fluoreszenzfarbstoffe permanent an das DNA-Origami gebunden, die Sequenz war entsprechend verlängert (21 Nukleotide). Durchgeführt wurden die Messungen an einem Weitfeldmikroskop, welches für die Durchführung der FRET-Experimente minimal angepasst werden musste. Um die Vergleichbarkeit der jeweiligen Experimente trotz unterschiedlicher Nanostrukturen zu bewahren, ist der *STAR RED* für beide Messmethoden genutzt worden.

Die mittels DNA-PAINT aufgelösten Abstände zeigten für die designte Distanz von 6 nm eine eindeutige Übereinstimmung. Für die theoretischen Werte von 5,9 nm wurde eine Verzerrung der gemessenen Abstände bedingt durch den crossover festgestellt. Werden die *docking strands* über einem crossover gelegt, resultiert ein geringerer Abstand. Ist kein crossover vorhanden, wölbt sich die DNA [163], sodass ein größerer Abstand vermessen wird.

Die FRET-Ergebnisse mit dem *Abberior STAR RED* am gleichen Messaufbau lieferten keine quantitativ zu analysierenden Daten. Teilweise zeigte sich in den FRET-Werten eine trennbare Population, deren Mittelwert auf einen Abstand zurückgeführt werden konnte, der gut mit dem supraaufgelösten Abstand übereinstimmt. Die sonst breiten Verteilungen in den Histogrammen der E-Werte indizierten, dass der *Abberior STAR RED* durch photo-induzierte Prozesse und Interaktionen mit dem Rückgrat der DNA oder der Nähe zum Donor beeinflusst wird [205]. Die Anpassung einer Doppelgaußfunktion an die Verteilungen wurde vor diesem Hintergrund nicht vorgenommen und verdeutlicht, dass der *Abberior STAR RED* aufgrund seines inkonsistenten Verhaltens ohne ROXS-System

ungeeignet für solche FRET-Experimente ist, da dieses in Konkurrenz mit dem eigentlichen Erwartungswert steht und die Ausbeute an verwertbaren Datenpunkten stark reduziert. Die qualitative Datenauswertung der FRET-Ergebnisse mit dem *Abberior STAR RED* an den eingesetzten DNA-Origami Nanostrukturen in dieser Arbeit führt zu einer prinzipiellen Aussage: Es ist möglich die Durchführung von FRET-Experimenten an einem für die Superauflösungsmikroskopie ausgelegten Weitfeld-Aufbau zu realisieren. Dieser wurde nicht wesentlich verändert und durch einfach zu handhabende Bauteile erweitert. Ein komplexer Umbau und aufwendige Justierungen waren nicht nötig, wodurch diese Applikation für ein breites Anwenderfeld nutzbar wird. Einschränkungen liegen in der Nutzung der Verschlussblenden, welche die Alternierungsfrequenz auf Dauer nicht adäquat ausführen.

Zur quantitativen Datenauswertung ist im weiteren ein für FRET-Experimente etablierter konfokaler Aufbau genutzt worden, mit dem die DNA-Origami Nanostrukturen in Lösung untersucht wurden. In diesem Rahmen ist der *Abberior STAR RED* durch den *ATTO[®] 647N* ersetzt worden, welcher nun fest in der Nanostruktur integriert wurde. Dadurch wird die Labelingeffizienz erhöht als auch die Möglichkeit gegeben, die zur absoluten Energieübertragungseffizienz benötigten Korrekturfaktoren nach einem allgemeingültigen Protokoll zu bestimmen [188]. Die durchgeführte Vermessung der DNA-Origami Nanostruktur zeigte, dass eine deutliche Abweichung von über 50 % zum theoretischen E-Wert vorliegt. Die Abweichung vom Erwartungswert geht auf die Flexibilität der Linker zwischen DNA und Farbstoff sowie auf die Flexibilität der Nanostruktur bedingt durch einzelsträngig vorliegende DNA und die damit verbundene spektrale Fluktuation zurück [207] [205]. Im Vergleich zu den DNA-PAINT-Messungen zeigten die FRET-Abstände einen identischen Trend bezüglich der Verzerrungen in Abhängigkeit des Vorhandenseins von interhelikalen Verbindungen. Wie in der Superauflösungsmikroskopie wird für das FRET-Paar zwischen einem crossover ein kleinerer Abstand bestimmt. Die Ergebnisse beider Experimente stehen in guter Korrelation zueinander, wenngleich die FRET-Werte stärkeren Einflussfaktoren unterliegen.

Durch das Vordringen der Superauflösungsmikroskopie in den Messbereich von FRET ist in dieser Arbeit die bestehende Lücke zwischen beiden Methoden mit Hilfe von DNA-Origami Nanostrukturen geschlossen worden. Die Superauflösungsmikroskopietechnik DNA-PAINT erlaubt den Vergleich zu FRET-Abständen und verdeutlicht die enorme Sensitivität dieser Methode. Der hier vorgestellte Ansatz kann wichtige Beiträge zur Grundlagenforschung liefern und Anstöße geben, Methoden zur Verbesserung und Beweisbarkeit der Korrelation zwischen Superauflösung und FRET zu entwickeln.

4.5 Überprüfung der Proteinhybridisierung an eine DNA-Origami Nanostruktur

4.5.1 Hybridisierung des Proteins über sechs capture-DNA-Stränge

Wie bereits beschrieben, wurden die DNA-Origami Nanostrukturen zur Immobilisierung des HFQ-ähnlichen Proteins zunächst mit sechs 21 Nukleotide langen Strängen hergestellt. Dies sollte eine permanente Bindung des HFQ-Proteins sicherstellen. Die Interaktion zwischen NRO und HFQ wurde mittels AFM untersucht. Die Nanostrukturen wurden nach Angaben der Kapitel 3.1.4 sowie 3.1.5 gefaltet und aufgereinigt. Die Proben wurden gemäß Kapitel 3.1.6.2 mit dem Protein inkubiert und nach Kapitel 3.2.4 vorbereitet und vermessen. Abbildung 4.26 zeigt die entsprechende schematische Darstellung der verwendeten Nanostruktur sowie die erhaltenen Ergebnisse der Untersuchung der Proben mittels AFM.

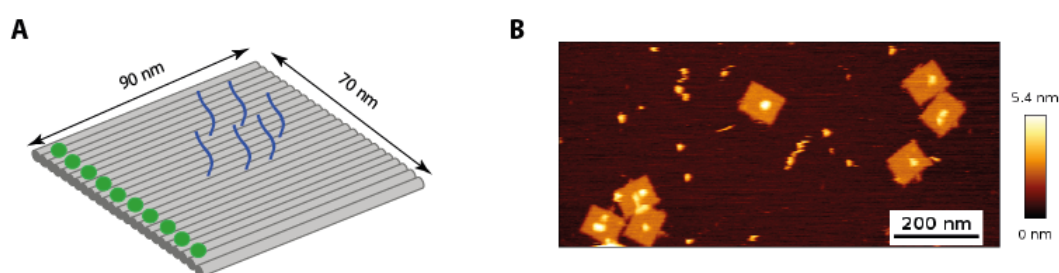


Abbildung 4.26: Schematische Darstellung (A) der genutzten Nanostruktur und AFM-Ergebnisse der Bindung (B) des Proteins an das DNA-Origami mit sechs *capture strands*.

Die schematische Darstellung der genutzten Nanostruktur in Abbildung 4.26 A zeigt, dass sechs 21 Nukleotide lange DNA-Einzelstränge aus dem NRO ragen. An diese hybridisieren die komplementären Stränge, die an das Protein gekoppelt worden sind. Abbildung 4.26 B zeigt, dass die DNA-Origami Nanostrukturen Proteine gebunden haben. Die Intensitätsskala indiziert die Höhe der untersuchten Strukturen und bestätigt die Kombination aus DNA-Origami (Höhe: ~ 2 nm) und dem HFQ-Protein (Höhe: ~ 3 nm). Das Protein liegt außerdem auf der Mica-Oberfläche vor. Die hellen Sphären, die das Protein repräsentieren, sind sehr breit und teilweise finden sich mehrere Punkte auf einer einzelnen Nanostruktur. Dies führt zu dem Schluss, dass mehrere Proteine durch die sechs *capture strands* an eine Nanostruktur gebunden werden.

Um dies zu überprüfen, sind nur noch zwei *capture strands* in die Nanostruktur integriert worden. Schematisch ist dies in Abbildung 4.27 A illustriert. Ebenso sind die Ergebnisse der AFM-Messung sind in Abbildung 4.27 B gezeigt

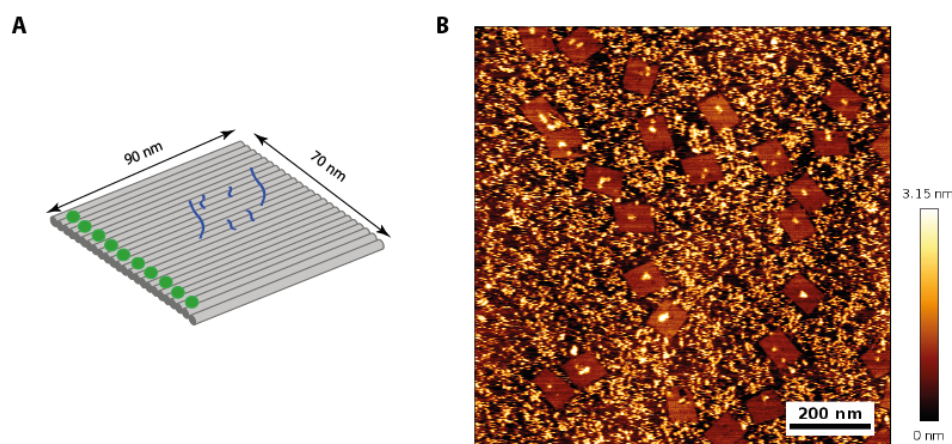


Abbildung 4.27: Schematische Darstellung (A) der genutzten Nanostruktur und AFM-Ergebnisse der Bindung (B) des Proteins über zwei *capture strands*.

Das Schema der genutzten Nanostruktur in Abbildung 4.26 A zeigt, dass zwei 21 Nukleotide lange DNA-Einzelstränge aus dem NRO ragen. Die vier weiteren sind entsprechend gekürzt worden. Abbildung 4.27 B ist bedingt durch die hohe Dichte an Protein auf der Oberfläche nicht eindeutig zu interpretieren. Sofern das HFQ-Protein nicht auf der Oberfläche zu finden ist, ist es an die meisten DNA-Origamis gebunden. Deutlich wird in Abbildung 4.27 B, dass die Spots in vielen Fällen schmaler und feiner sind als in Abbildung 4.26. Im oberen rechten Bereich von Abbildung 4.27 B sind auf einer Nanostruktur zwei Spots, die durch eine kleine Einkerbung getrennt werden, zu erkennen. Dies bestätigt die Annahme, dass mit zunehmender Anzahl an *capture strands* entsprechend mehrere Proteine an ein DNA-Origami gebunden werden. Die Unterschiede in der Intensitätsskala lassen sich auf Abbildungsfehler durch das zusätzliche auf der Oberfläche gebundene Protein erklären. Um eine adäquate Darstellung des HFQ-Proteins am Weitfeld-Aufbau zu erhalten, wurde für die Immobilisierung eines einzigen Proteins nur ein *capture strand* verwendet. Das Abbilden mehrerer Proteinstrukturen auf der gleichen Nanostruktur würde die Ergebnisse der Superauflösungsmikroskopie deutlich beeinflussen.

4.5.2 Hybridisierung des Proteins über einen capture-DNA-Strang und fünf Haltestränge

Im Folgenden werden die Ergebnisse der DNA-Origami-Protein-Assemblierung über einen *capture strand* vorgestellt. Um die spezifische Wechselwirkung der DNA-Origami Nanostrukturen mit dem Protein zu prüfen, wurden zwei unterschiedliche DNA-Origami-Nanostrukturen hergestellt. Zum einen waren wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, sechs Anbindestränge (ein *capture strand* und fünf kurze Haltestränge) vorhanden, zum anderen wurden eben diese nicht integriert. Idealerweise hybridisiert das Protein ausschließlich an

jene DNA-Origamis, die über sechs komplementäre Stränge verfügen. Die schematische Darstellung der entsprechenden Nanostrukturen ist in folgender Abbildung 4.28 gezeigt.

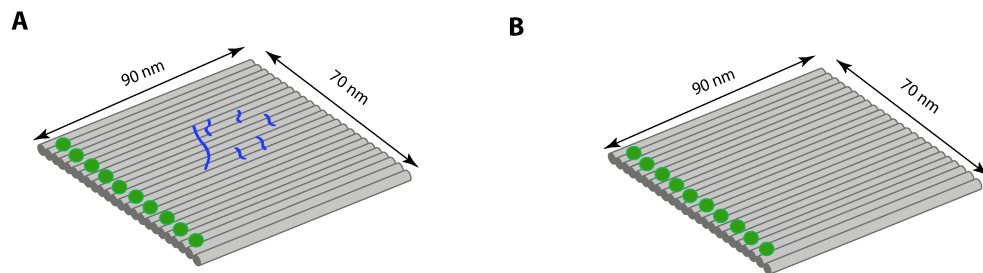


Abbildung 4.28: Schematische Darstellung der Nanostruktur zur Prüfung der Interaktionen des Proteins. A: Schema der DNA-Origami Nanostruktur, in der die Verlängerungen der sechs DNA-Anbindestränge zur spezifischen Hybridisierung des HFQ-Proteins vorhanden sind. B: Schema der DNA-Origami Nanostruktur, in der die Verlängerungen der sechs DNA-Anbindestränge fehlen.

Um unspezifische Wechselwirkungen direkt auszuschließen, werden zunächst die Ergebnisse der Hybridisierung betrachtet, in denen die DNA-Origamis nicht über die Verlängerungen zur Proteinkopplung verfügen. Diese *Negativkontrolle* gibt den größtmöglichen Hinweis über unspezifische Interaktionen zwischen Protein und Nanostruktur. Entsprechend Kapitel 3.1.6.2 wurden die DNA-Origami Nanostrukturen mit dem Protein inkubiert und nach Kapitel 3.2.4 für die Messung mittels AFM vorbereitet und vermessen. Abbildung 4.29 zeigt die entsprechenden Ergebnisse.

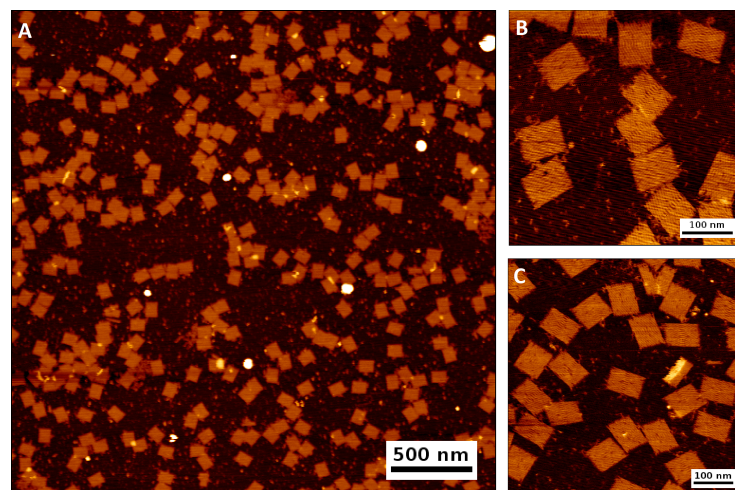


Abbildung 4.29: Ergebnisse der Negativkontrolle. A: Übersicht der DNA-Origami Nanostrukturen, denen die Verlängerungen der sechs Anbindestränge zur spezifischen Hybridisierung des HFQ-Proteins fehlen, gezeigt mit einer Skalierung von 500 nm. B und C: Vergrößerung eines vermessenen Ausschnitts mit einer Skalierung von 100 nm.

In Teilabbildung 4.29 A ist eine Übersicht des per AFM vermessenen Ausschnitts gezeigt. Das punktförmige Protein ist auf der Oberfläche zu finden, aber nicht spezifisch mit den DNA-Origami Nanostrukturen hybridisiert. Unspezifische Wechselwirkungen zwischen Protein und DNA liegen somit nicht vor. Von den in Abbildung 4.29 A gezeigten 255 Strukturen zeigen lediglich elf DNA-Origami Nanostrukturen eine leicht höhere Intensität in zentraler Position. Über 95 % der Proteine sind demnach nicht auf den Nanostrukturen gebunden. Die Proteine liegen zufällig verteilt auf der Mica-Oberfläche und interagieren nicht mit der DNA. Die deutlich helleren Stellen zwischen den DNA-Origami Nanostrukturen spiegeln Artefakte des Puffers (Salzkristalle) oder aggregierte Proteine wieder. Teilweise liegen DNA-Origamis übereinander, was sich in einer höheren Intensität zeigt. Anschaulicher ist dies in den beiden Nahaufnahmen in Abbildung 4.29 B und C dargestellt. Im unteren rechten Ausschnitt der Abbildung 4.29 C findet sich eine heller dargestellte Erhebung in zentraler Position auf einem DNA-Origami. Hierbei kann es sich um ein Protein handeln. Bei mehrmaligem Vermessen solcher Stellen sind keine reproduzierbaren Aufnahmen erzeugt worden. Proteine, die zufällig auf den Nanostrukturen liegen, sind nicht kovalent an diese gebunden und lassen sich durch erneutes Vermessen mit der Nadelspitze von der Nanostruktur schieben oder können von der Struktur diffundieren. Es ist eindeutig gezeigt, dass bei fehlenden Anbindesträngen keine spezifische Interaktion zwischen dem HFQ-Protein und den DNA-Origami Nanostrukturen vorliegt.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der *Positivkontrolle* dargestellt. Bei dieser sind die sechs Anbindestränge (ein *capture strand* und fünf kurze Haltestränge) in das DNA-Origami integriert worden, vergleiche Kapitel 3.1.4. Die Proteine interagieren idealerweise spezifisch mit den Nanostrukturen nach dem sie mit ihnen inkubiert wurden. Die Ergebnisse der Rasterkraftmikroskopie sind in Abbildung 4.30 illustriert.

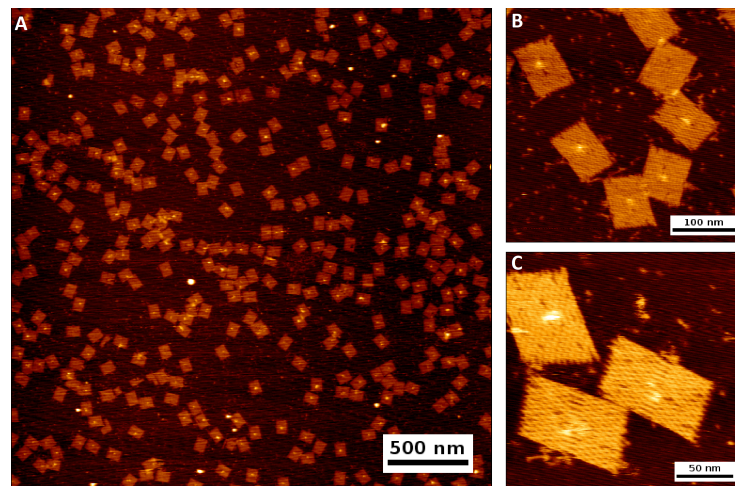


Abbildung 4.30: Ergebnisse der Positivkontrolle. A: Übersicht der DNA-Origami Nanostrukturen, die die sechs Anbindestränge zur spezifischen Hybridisierung des HFQ-Proteins tragen, gezeigt mit einer Skalierung von 500 nm. B und C: Vergrößerung eines vermessenen Ausschnitts mit einer Skalierung von 100 nm und 50 nm.

Abbildung 4.30 A zeigt eine Übersicht der Ergebnisse. Im Gegensatz zur Negativkontrolle finden sich in Abbildung 4.30 auf 179 von 207 (86 %) gezeigten DNA-Origami Nanostrukturen zentral positionierte helle Erhebungen. Diese lassen sich bei wiederholter Rasterung nicht von dieser Position entfernen. Es handelt sich bei diesen Erhebungen um spezifisch mit der Nanostruktur hybridisierte Proteine. Deutlicher ist dies in Abbildung 4.30 B und C dargestellt. Die jeweiligen Vergrößerungen (100 nm und 50 nm) zeigen korrekt gefaltete DNA-Origami Nanostrukturen, von denen der Großteil ein HFQ-Protein trägt. Sind die entsprechend designten Anbindestränge integriert, wird ein einzelnes Protein gezielt auf einer sich selbst-assemblierenden Nanostruktur platziert.

Erneut ist eine Vielzahl an ungebundenem Protein auf der Mica-Oberfläche zu sehen. Aufgrund der stark negativen Ladung von HFQ ist es nicht möglich eine Agarosegel-Aufreinigung der DNA-Origami-HFQ Probe durchzuführen und diese von ungebundenen Proteinen zu trennen. Andere Reinigungsansätze wie die Inkubation mit diversen Konzentrationen von *Tween20* oder *Triton X-100* führten letztlich zur Denaturierung der DNA-Origami Nanostrukturen aufgrund lytischer Effekte [208] [209]. Die Nanostruktur wird somit zerstört und eine spezifische Bindung des Proteins kann nicht mehr erfolgen. Eine Möglichkeit bietet die sogenannte *Free-Flow-Elektrophorese*. Die DNA-Origami Nanostrukturen werden dazu mit rekombinanten Enzymen modifiziert, welche die Aufreinigung der Nanostruktur ermöglichen [210]. Für den Komplex aus DNA-Origami und Protein ist bislang jedoch noch keine Möglichkeit erarbeitet worden, um die gewünschten Strukturen vom überschüssigen Protein zu befreien.

4.6 Untersuchung der Kopplungseffizienz

Die spezifische Wechselwirkung zwischen HFQ-Protein und DNA-Origami Nanostruktur ist in Kapitel 4.5 gezeigt worden. Trotz der spezifischen Click-Reaktion des DBCO sind durchaus weniger einzelsträngige DNA-Sequenzen mit dem Protein verbunden, siehe Kapitel 3.1.2. Für die Untersuchung der Kopplungseffizienz von DNA an das HFQ-Protein ist dieses mit einer *ATTO*[®]647 markierten DNA-Sequenz inkubiert worden. Für weitere Charakteristika dieses Farbstoffs sei auf [211] verwiesen. Die Sequenz ist im Folgenden gezeigt:

5'*ATTO*[®]647- TTT ATA ATG TGC AGT CCG AAA -DBCO -3'

Die aufgereinigte Probe wurde am Weitfeld-Mikroskop untersucht. Die Intensitätsspur sind mit einer *Andor* Software analysiert worden. Dadurch konnte das Bleichen der an das Protein gekoppelten Farbstoffe analysiert werden. Im Folgenden ist für eine diverse Anzahl an Bleichschritten je eine beispielhafte Intensitätsspur gezeigt.

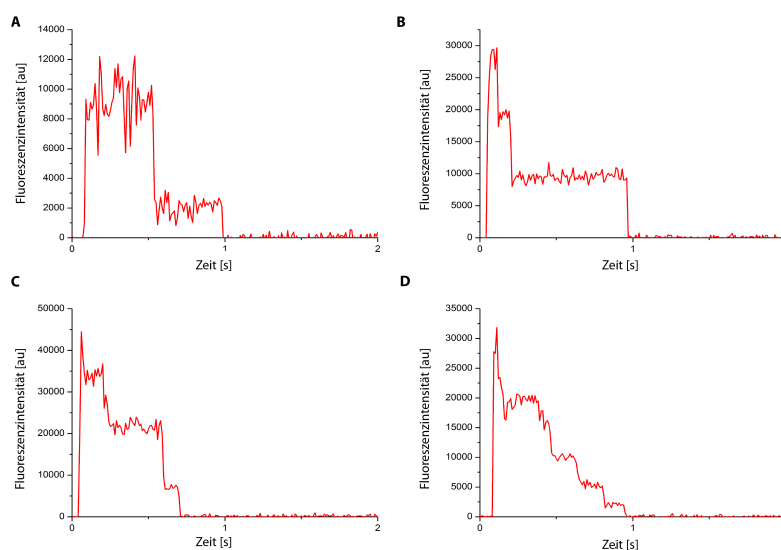


Abbildung 4.31: Bleichschritte in Abhängigkeit der gekoppelten Farbstoffe.

Die in Abbildung 4.31 beispielhaft gezeigten Bleichschritte verdeutlichen, dass jeweils eine unterschiedliche Anzahl von farbstoffmarkierter DNA an das HFQ-Protein gekoppelt wurde. Um ein vorzeitiges Bleichen der Farbstoffe zu verhindern, ist eine Verschlussblende, die sich im Mikroskopkörper befand, geschlossen worden. Diese wurde unmittelbar nach dem Start der Messung geöffnet und begründet die fehlende Intensität der Farbstoffe zu Beginn jeder Spur. Weiterhin sind keine einzelnen Bleichschritte in der Analyse betrachtet worden, da diese auch bei der Superauflösungsmikroskopie keine verwertbaren Informationen liefern.

Abbildung 4.31 A zeigt zwei Stufen bis die Intensität des Farbstoffs erlischt. Die Anzahl Bleichschritte in einer Intensitätsspur entspricht den an das Protein gebundenen Farbstoffen. Die Abbildungen 4.31 B bis D zeigen, dass drei, vier und fünf gebundene Fluorophore quantifiziert worden sind.

Die jeweiligen Bleichschritte beziehungsweise äquivalent die gebundenen Farbstoffmoleküle wurden gezählt und in folgendem Histogramm 4.32 dargestellt.

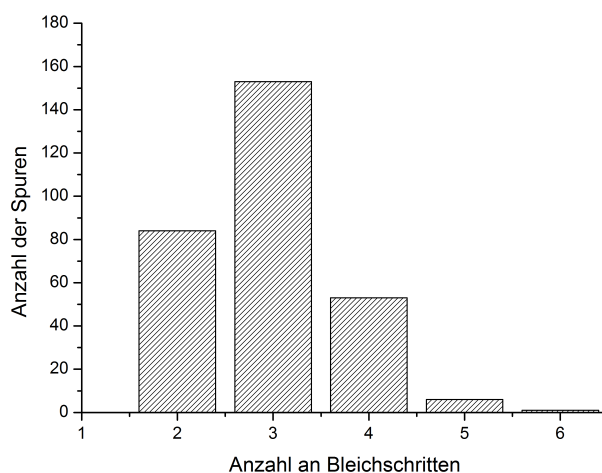


Abbildung 4.32: Histogramm der analysierten Bleichschritte in Abhängigkeit der gekoppelten Farbstoffe.

Abbildung 4.32 zeigt die Verteilung der an das Protein gekoppelten farbstoffmarkierten DNA. Deutlich wird, dass vorwiegend zwei oder drei Farbstoffe an dem Protein gebunden sind. Am seltensten sind Proteine mit mehr als vier Farbstoffmolekülen analysiert worden. Dies steht grundsätzlich in Relation mit den Ergebnissen der Superauflösungsmikroskopie, siehe Kapitel 4.7. Hier wurden ebenfalls besonders häufig Strukturen mit zwei oder drei Anbindesträngen abgebildet. Ein direkter Vergleich zwischen Superauflösung und Bleichschrittanalyse ist jedoch nicht möglich, da für die jeweiligen Messungen die Proteine entsprechend hergestellt worden sind. Außerdem sind für die Datenanalyse der Superauflösung explizit Protein-DNA-Konjugate gewählt worden, die eine hohe Kopplungseffizienz aufwiesen. Demnach können durchaus Unterschiede in der Kopplungseffizienz vorliegen.

4.7 Superauflösungsmikroskopie eines auf ein DNA-Origami gespannten Protein

Für die superaufgelöste Darstellung des mit dem DNA-Origami hybridisierten Proteins wurde das in Kapitel 3.1.2 beschriebene DNA-Origami eingesetzt und entsprechend Kapitel 3.1.6.3 für die DNA-PAINT Messung vorbereitet. Die Auswertung erfolgte nach Kapitel

3.2.1.

Um den durch die Messdauer bedingten möglichen Drift aus den superaufgelösten Bildern zu korrigieren, sind die mittels *Matlab* Algorithmus kompilierten Daten zunächst in eine kommerzielle Software eingeladen worden. Die *GATTAnalysis* Software der Firma **GATTAQUANT GmbH** ist für eine solche Korrektur anwendbar [138]. Diese nutzt die in der Probe ebenfalls befindlichen *Fiducial marker* als Referenzpunkte (vergleiche Kapitel 2.2.2.1 und 3.1.6.2) und rechnet die Lokalisationen über die Zeit auf eine bestimmte Startkoordinate zurück [138].

Die Drift-korrigierten Daten der superaufgelösten Bilder sind anschließend in die *LabVIEW* Software geladen und mit den beugungsbegrenzten Aufnahmen im grünen Kanal übereinandergelegt worden. Diese Kolokalisation erfolgte manuell durch verschieben des superaufgelösten Bildes. Dabei resultierte eine Verschiebung von 100 nm bis 200 nm in x-Richtung und -50 nm bis -100 nm in y-Richtung. Die superaufgelösten Proteine befanden sich vor dieser Verschiebung stets in der unteren linken Ecke eines beugungsbegrenzten Spots. Dies resultiert aufgrund *chromatischer Aberrationen*. Chromatische Aberrationen treten auf, wenn farbiges Licht auf eine Linse tritt. Dabei wird das Licht unterschiedlich stark gebrochen und trifft nicht auf dem gleichen Punkt zusammen. Rotes Licht besitzt eine größere Wellenlänge als grünes und wird weniger stark gebrochen [212].

Auffällige Anordnungen dienten ebenfalls als Orientierungspunkte, um die Proteine zentral auf den beugungsbegrenzt aufgenommenen DNA-Origamis zu platzieren. Anschließend sind die kolokalisierten Spots manuell ausgewählt und deren Abstände durch den automatischen Algorithmus bestimmt worden. Nach Kapitel 3.2.1.2 kann diese Standard-Software keinen korrekten Abstand für mehr als zwei Spots liefern. Solche Strukturen wurden mit Hilfe einer weiteren Software ausgewertet, siehe Kapitel 3.2.1.2. Die Analyse der kolokalisierten Strukturen durch die entsprechende DNA-PAINT-Messung ergab eine breite Verteilung hinsichtlich der Anzahl von abgebildeten Spots. Diese reichten von einzelnen Spots bis hin zur maximalen und im Idealfall vorliegenden Anzahl von sechs Spots. Mit zunehmender Anzahl gekoppelter DNA-Einzelstränge erscheinen die abgebildeten Strukturen als zusammenhängende Ansammlung von Lokalisationen und lassen sich nicht mehr getrennt voneinander auflösen. Dabei entsprechen die abgebildeten Strukturen dem in Abbildung 3.5 gezeigten Schema. Vor diesem Hintergrund ist die Abstandsbestimmung ausschließlich für Doppel- und Dreifachspots durchgeführt worden, die deutlich als solche identifiziert wurden. In der folgenden Abbildung 4.33 sind die so erhaltenen Ergebnisse dargestellt.

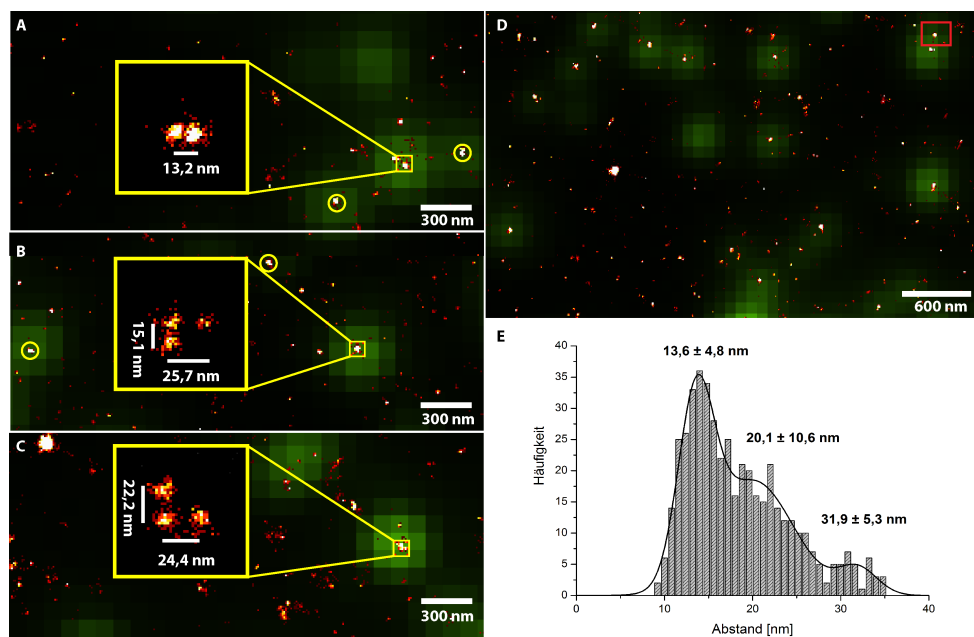


Abbildung 4.33: Ergebnisse der superaufgelösten Darstellung eines Proteins auf einer DNA-Origami Nanostruktur. A-C: Beispielhafte Darstellung von kolokalisierten Spots ($50 \cdot 50$ Pixel) mit einem Binning von 1 nm pro Pixel auf einer DNA-Origami Nanostruktur. In A erfolgte die Abstandbestimmung automatisch. In B und C sind die Spots entsprechend rotiert und separiert worden, um die Abstände zwischen ihnen bestimmen zu können. D: Ausschnitt der Oberfläche. E: Histogramm der Abstände der analysierten Doppel- und Dreifachspots.

In Abbildung 4.33 A-C ist eine beispielhafte Auswahl an Doppel- und Dreifachspots gezeigt, für die eine Abstandsbestimmung durchgeführt wurde. Die Abstände der Doppelslots sind maßgeblich durch den in Kapitel 3.2.1.2 beschriebenen Algorithmus bestimmt worden. Die Dreifachspots hingegen wurden jeweils manuell orientiert und vermessen, siehe dazu ebenfalls Kapitel 3.2.1.2. Auffällig ist die hohe Intensität dieser Spots im Vergleich zu ungebundenem, auf der Oberfläche befindlichem Protein. Dies impliziert eine hohe Lokalisierungsanzahl und bekräftigt ein spezifisches Wechselwirken der Imager mit den DNA-PAINT-Srängen des Proteins. Die ebenfalls mit einem gelben Kreis markierten Spots zeigen weitere kolokalisierte, zur Analyse ausgewählte Proteine, die an eine DNA-Origami Nanostruktur gebunden haben. In Abbildung 4.33 C ist oben links eine große Ansammlung an Lokalisationen zu erkennen. Dies repräsentiert einen zur Driftkorrektur eingesetzten *Fiducial marker*. Ein solcher findet sich zusätzlich im gezeigten Ausschnitt der Oberfläche in Abbildung 4.33 D. Dieser Ausschnitt zeigt, dass besonders helle Strukturen mit vielen Lokalisationen zum Großteil mit den DNA-Origamis hybridisiert vorliegen. Aus weiteren Messungen ergab sich im Mittel eine 85 % Hybridisierung von einem Protein auf einer Nanostruktur, was mit guter Übereinstimmung bereits in Kapitel 4.5 dargestellt wurde. Aus Abbildung 4.33 D geht zusätzlich hervor, dass die zentrale Position der Proteine auf

der beugungsbegrenzten Aufnahme teilweise variiert. Dies ist auf das externe Labeling der DNA-Origami Nanostrukturen mit dem grünen Farbstoff zurückzuführen. Die Effizienz der Markierung kann für jede Nanostruktur unterschiedlich sein. Auch die Position der Markierungen am äußeren Rand der DNA-Origami Nanostruktur kann die Darstellung verändern. Trotzdem können solch kolokalisierte Proteine für die Auswertung berücksichtigt werden. Ausgeprägt ist weiterhin die Häufigkeit an Lokalisierungen abseits der DNA-Origamis. Obwohl die vorbereitete Oberfläche mehrfach mit Puffer, Milli Q und Hochsalz (1 M NaCl) gespült wurde, um ungebundenes Protein zu entfernen, interagiert HFQ dennoch mit dem BSA/Biotin-NeutrAvidin der damit abgesättigten Glasoberfläche. Teilweise liegen diese Ansammlungen auch nahe der DNA-Origami Nanostrukturen, siehe dazu hervorgehoben Abbildung 4.33 D rechts oben. In solchen Fällen ist keine Struktur für die Analyse ausgewählt worden, da keine korrekte Zuordnung vorgenommen werden konnte. Bislang ist keine Möglichkeit erarbeitet worden, um die gewünschten Strukturen vom überschüssigen Protein zu befreien. Der Einsatz der Kolokalisierung ist bisher die routinierteste Methode, die gezielte Betrachtung der korrekt hybridisierten Strukturen zu realisieren.

Die analysierten Abstände der Doppel- und Dreifachspots sind in einem Histogramm dargestellt, siehe Abbildung 4.33 E. Auffällig ist die sehr breite Verteilung an analysierten Abständen, die sich über einen Bereich von 10 nm bis 35 nm erstreckt. Dies zeigt die in Kapitel 3.1.2 bereits angesprochene hohe Flexibilität und Komplexität innerhalb des betrachteten biologischen Systems. Aus der breiten Verteilung treten zwei Maxima bei Abständen von **13,6 nm \pm 4,8 nm** und **31,9 nm \pm 5,3 nm** hervor, die gut mit den theoretischen Werten 14,2 nm und 28,4 nm übereinstimmen. Neben dem ersten Maximum fällt eine breite Schulter ab. Deren Zentrum wird zu **20,1 nm \pm 10,6 nm** bestimmt. Dieser Wert weicht mit einer sehr großen Standardabweichung deutlicher vom theoretischen Wert von 24,63 nm ab. Hier scheint eine besonders hohe Flexibilität in den DNA-Strängen vorzuliegen. Die eingesetzten Poly-T-Linker sind ein möglicher Grund dafür. Um das Protein in der vorgegeben Position zu platzieren, mussten unterschiedlich lange Linker verwendet werden. Dadurch konnte das Protein nicht völlig starr auf die DNA-Origami Nanostruktur gebunden werden, sondern ist in einem gewissem Rahmen beweglich, siehe Kapitel 3.1.2. Dabei ist auch die Anzahl an gebundenen DNA-Strängen bedingt durch das Design der Nanostruktur nicht eindeutig nachvollziehbar. Auch die Abweichung hin zu größeren Abständen ist bei der Untersuchung von DNA-Origami Nanostrukturen eher ungewöhnlich. Dies impliziert eine auf das Protein wirkende Kraft, die dieses streckt. Auch dies kann durch den Einsatz der Poly-T-Linker bedingt werden. Die angegebenen Erwartungswerte beziehen sich ausschließlich auf die Länge der DNA, die an das Protein gekoppelt wurde, siehe Abbildung 3.5. Wie an dieser Stelle bereits erwähnt, sind der *capture strand* und die Haltestränge durch unterschiedlich lange Poly-Thyminketten in Richtung der Proteinposition gebracht worden. Dadurch kann die Bindung an einigen Stellen durchaus steifer als auch variabler sein. Die kovalente Bindung

und Darstellung eines Proteins auf dem NRO kann dennoch durch die analysierten Werte bestätigt werden.

Neben den in der Abstandsbestimmung betrachteten Doppel- und Dreifachspots sind Strukturen abgebildet worden, die über eine größere Anzahl an Spots verfügt. Diese sind in der folgenden Abbildung 4.34 gezeigt.

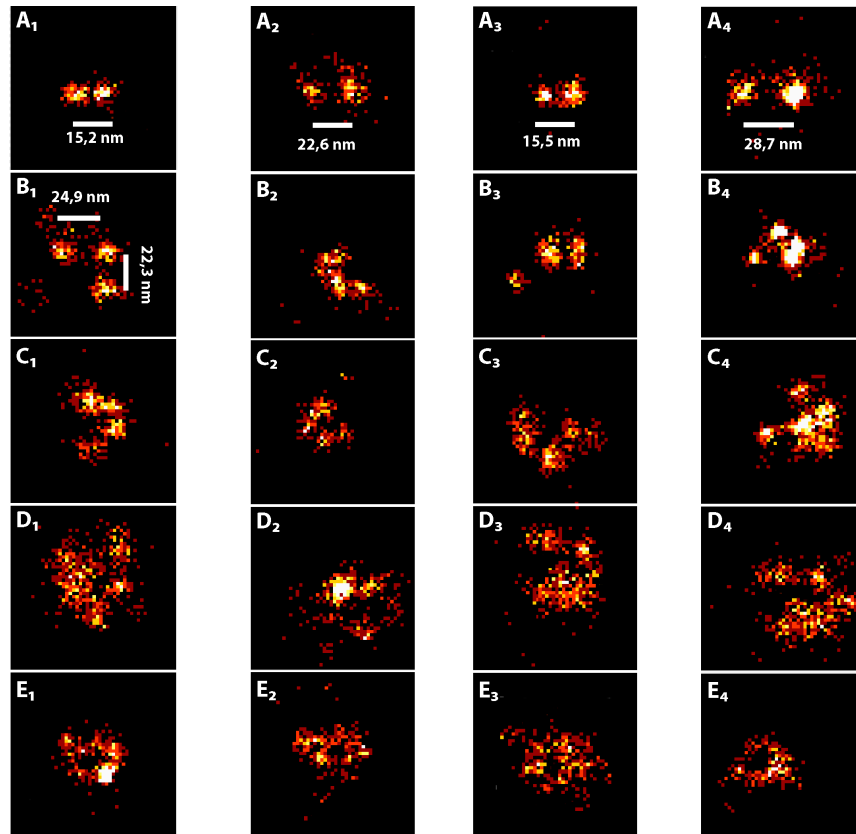


Abbildung 4.34: Ergebnisse der supraauflösten Darstellung eines Proteins auf einer DNA-Origami Nanostruktur. A-E: Mit fortlaufender Bezeichnung steigt die Anzahl der abgebildeten Anbindestellen. Für jede Anzahl ist eine Auswahl an vier beispielhaften Strukturen (50 · 50 Pixel) mit einem Binning von 1 nm pro Pixel gezeigt.

In Abbildung 4.34 sind beispielhaft vier Strukturen für eine jeweilige Anzahl an abgebildeten Anbindestellen gezeigt. Von oben nach unten (Abbildung 4.34 A-E) steigt die Zahl von zwei bis zu sechs Spots. Je höher deren Anzahl, umso besser ist eine Ringstruktur zu erkennen, die einer Donut-Struktur ähnelt. Eine Unterscheidung der einzelnen Lokalisationen, wie es für die Beispiele in Abbildung 4.34 A und B gelingt, wird mit steigender Anzahl von abgebildeten Anbindestellen zunehmend schwieriger und unterliegt verstärkt der Subjektivität. Hauptkriterium der Unterscheidung zwischen Abbildung 4.34 D und E war vornehmlich die Geschlossenheit der Ringstruktur. Eine adäquate Bestimmung von Abständen innerhalb

solcher Strukturen kann nicht vorgenommen werden.

Gleichzeitig ist die Abstandsbestimmung bei niedrigeren Spotanzahlen teilweise nur eingeschränkt möglich. Sind die Spots zu nah beieinander, wie in Teilabbildung 4.34 B₂, ist die optische Unterscheidung einzelner Spots bereits eingeschränkt. Besonders bei Spots, die wie in Teilabbildung 4.34 B₃ und B₄ orientiert waren, konnte die Separierung in zwei Doppelspots erfolgreich zur adäquaten Abstandsbestimmung eingesetzt werden, siehe Kapitel 3.2.1.2. Durch die einfache Rotation des Bildwinkels und Betrachtung der drei Spots im Gesamten würden die Lokalisationssummen so überlappen, dass ein falscher Abstand generiert würde.

Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen, dass mit DNA-Strängen modifizierte Proteine auf eine selbstassemblierte DNA-Origami Nanostruktur immobilisiert werden können. Für einen Auszug aller betrachteten Strukturen wurden die Erwartungswerte für drei definierte Abstände durch die Superauflösungsmikroskopie in zuverlässigem Maß wiedergegeben. Neben den analysierten Doppel- und Dreifachspots sind Strukturen mit höherer Spotanzahl abgebildet worden. Diese erschienen im Idealfall ähnlich einer Ringstruktur mit einem Loch in zentraler Position. Aufgrund der diffusen Erscheinung wurde eine Abstandsbestimmung für solche Strukturen nicht durchgeführt. Mögliche Gründe für die relativ schlechte Ausbeute an vollständig markierten Strukturen sind die Einschränkungen in der Aufreinigung des Proteinkonjugates selbst und die nicht vollständig zu realisierende Bindung des Proteins an die DNA-Origami Nanostruktur. Neben der bevorzugten Anzahl von sechs gekoppelten DNA-Strängen beinhaltete die zu untersuchende Probe ebenfalls Konjugate mit fünf, vier oder drei gekoppelten DNA-Strängen. Weiterhin ist aufgrund des Designs der Nanostruktur davon auszugehen, dass das Protein selten mit allen fünf Haltesträngen interagiert. Wird die Flexibilität des NRO, die sich durch unterschiedliche Salzkonzentrationen einstellt [49], berücksichtigt, kann das Protein im Falle der festen Bindung durch den *capture strand* mit bis zu vier weiteren Haltesträngen assoziieren. Dies ist in der folgenden Abbildung 4.35 illustriert.

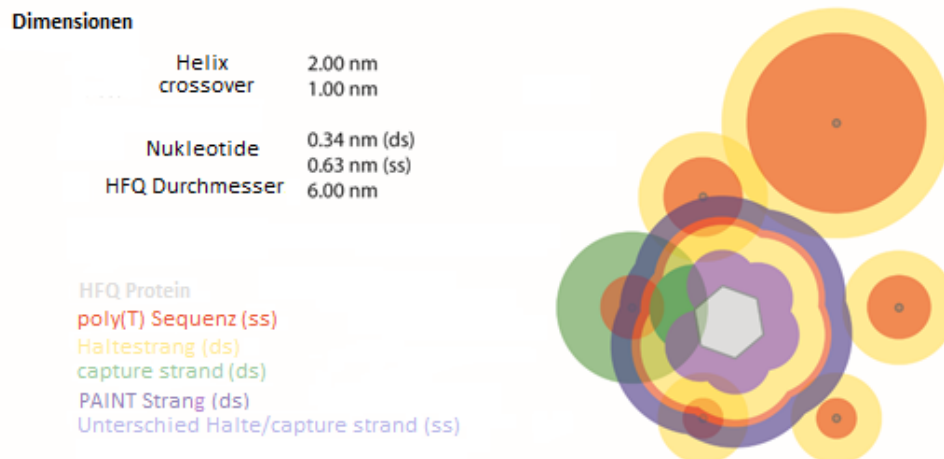


Abbildung 4.35: Dimensionen des HFQ-DNA-Komplex relativ zu den Ankerpunkten auf der Nanostruktur. Die Zentren der sechs orange farbigen Kreise mit gelben oder grünen Ringen zeigen die Koordinaten des *capture strand* (grüner Ring) und der Haltestränge (gelbe Ringe), die aus der DNA-Origami Nanostruktur heraus ragen. Der rötliche Kreis kennzeichnet die einzelsträngige (ss) Poly-T Sequenz, die Teil des jeweiligen PAINT-Strangs ist. Je nach Kopplungsposition an den *capture strand* variiert die Position des HFQ (grau) und somit auch die Anzahl an Haltesträngen, die eine Doppelbindung (ds) mit der Protein-DNA eingehen können. Die gelben Ringe der Haltestränge beziehungsweise der grüne Ringe des *capture strand* illustrieren die Dimensionen, die die oben genannte Doppelbindung ausbilden können.

Abbildung 4.35 zeigt die Zentren des *capture strand* (grüner Ring) und der Haltestränge (gelbe Ringe), die aus der DNA-Origami Nanostruktur heraus ragen. Durch die zusätzliche einzelsträngige (ss) Poly-T Sequenz, die in ihrer Länge variiert, um die an das Protein gekoppelte DNA zu erreichen, sind die Durchmesser der Kreise jeweils unterschiedlich. Die gelben Ringe der Haltestränge beziehungsweise der grüne Ringe des *capture strand* illustrieren die Dimensionen, die die oben genannte Doppelbindung ausbilden können. Der rötliche Kreis kennzeichnet die einzelsträngige (ss) Poly-T Sequenz die als Abgrenzung zur PAINT-Sequenz (lila) ist. Je nach Kopplungsposition an den *capture strand* variiert die Position des HFQ (grau) und somit auch die Anzahl an Haltesträngen, die eine Doppelbindung (ds) mit der Protein-DNA eingehen können. Abbildung 4.35 stellt schematisch dar, in wie weit die Dimensionen des *capture strand* und der Haltestränge mit den Maßen des Protein-DNA-Komplexes überlappen. Wird angenommen, dass der *capture strand* stets eine Bindung mit der komplementären DNA eingeht, ist davon auszugehen, dass eine Bindung über vier der sechs Haltestränge erfolgt. Je nach Kopplung an den *capture strand* ist eine Interaktion aller Haltestränge unwahrscheinlich. Die Bindung der PAINT-Stränge ist trotzdem möglich. Die Messwerte sind dadurch geringer als die in der Theorie ermittelten Abstände und resultieren in einer breiten Verteilung. Dennoch zeigen diese, dass sich ein

einzelnes HFQ-Protein mittels DNA-PAINT abbilden lässt und die erhaltenen Ergebnisse dessen allgemeiner Struktur entsprechen.

Die Untersuchung von Proteinen mit den Methoden der Superauflösungsmikroskopie etabliert sich immer weiter. Die Nutzung von modifizierten Enzymen (Halo- oder SnapTag) zur Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen und deren Abbildung beispielsweise durch dSTORM sind zu gängigen Methoden geworden [213]. Problematisch ist, wie bei allen Techniken, die Markierungsdichte und der begrenzte Auflösungsbereich der einzelnen Methoden. Die ersten superauflösenden Darstellungen von einzelnen Proteinen und deren konformellen Anordnungen wurden von Weisenburger et al. [31] publiziert. Der Abstand zwischen zwei Fluoreszenzmolekülen, die an zwei Domänen einer Histidinkinase gekoppelt wurden, wurde unter kryogenen Bedingungen zu 9 nm bestimmt. Das untersuchte Protein reguliert den Transport sowie den anaeroben Metabolismus von Zitrat [214]. Obwohl das Protein während der Messung in einer Matrix gehalten wurde, um Fluktuation und Diffusion zu vermeiden, war es willkürlich in der Probe orientiert. Dies führte wiederum zu einer hohen Anzahl an Positionen der Farbstoffmoleküle, was die Bestimmung einzelner Abstände in einem Protein erschwert [31]. An dieser Stelle ist die in dieser Arbeit gezeigte Methodik von wesentlichem Vorteil. Das Protein wird gezielt mit Hilfe der DNA-Origami Nanostruktur in einer bestimmten Position abgebildet, wodurch die vielfältige Orientierung der Farbstoffmoleküle reduziert wird. Der Einsatz kürzerer und starrer Linker zum Anbringen der Fluorophore an die DNA [215] [216] könnte die Genauigkeit der Lokalisierung zusätzlich verbessern.

Die Nutzung von Fluoreszenzmikroskopietechniken unter tiefen Temperaturen ist ein relativ neues Forschungsfeld. Dennoch etablieren sich diverse Erweiterungen und Kombinationen aus superauflösender Kryo-Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie (Korrelierte Mikroskopie) zunehmend, um die strukturellen Untersuchungen von biologischen Systemen zu verbessern [217] [218] [219]. Superauflösende Kryo-Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die Abbildung von biologischen Strukturen nahe ihres nativen Zustandes [220]. Ebenso kann das Photobleichen oder Zerstörung des Farbstoffs [221] sowie das Signal-zu-Rauch-Verhältnis deutlich reduziert werden. Neben technischen Schwierigkeiten ist das Verhalten der Fluorophore bei solch niedrigen Temperaturen bisher nicht eindeutig charakterisiert [222] [223] und auch die hohen Laserintensitäten können das kristalline Eis verändern und die biologischen Proben schädigen [219] [224]. Das in [31] gezeigte neue Vorgehen stellt in diesen Zusammenhang eine gute Alternative dar. Diesen Ansatz mit dem in dieser Arbeit vorgestellten DNA-Origami-Protein Komplex zu kombinieren, kann neue Möglichkeiten für die superaufgelöste Darstellung von Proteinstrukturen zulassen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden Abstände im Nanometerbereich zwischen zwei Punktlichtquellen auf einer DNA-Origami Nanostruktur mittels supraauflösender Mikroskopie visualisiert. Die gemessenen Abstände wurden weiterhin durch die strahlungslose Energieübertragung nach Förster untersucht. Dazu ist der gleiche Mikroskop-Aufbau für die Durchführung der DNA-PAINT und FRET verwendet worden. Um das vorhandene Messsystem für die Kombination beider Experimente zu etablieren, sind für die erfolgreiche Umsetzung der jeweiligen Messmethode entsprechend spezifische Nanostrukturen konzipiert worden. Die Position der Abstände war hierbei identisch, deren Vermessung erfolgte jeweils an unterschiedlichen DNA-Origami Nanostrukturen. Für die FRET-Experimente wurde der DNA-PAINT-Farbstoff eingesetzt, um dessen Eignung für eine nachfolgende FRET-Messung zu prüfen.

Mit dem bislang für DNA-PAINT nicht eingesetzten Farbstoff *Abberior STAR RED* ist die Abbildung des theoretisch bestimmten Werts von 6 nm gelungen. In der Theorie sollten die beiden zusätzlich designten Abstände einen Wert von 5,9 nm zeigen. Dies konnte nicht eindeutig bestätigt werden. Ein Abstand befand sich direkt über einem crossover zwischen den DNA-Helices. Dieser wirkte sich in einer Verzerrung der gewählten Position aus, wodurch sich ein größerer sowie ein kleinerer Abstand ergab. Um diese Beobachtung zu verifizieren, wäre die Untersuchung der Struktur durch ein *Kryo-Elektronenmikroskop* sinnvoll. Bei dieser werden Proben bei Temperaturen von -150°C vermessen. Aus den erhaltenen Aufnahmen des Objekts kann ein 3D-Modell erstellt werden, das Aufschluss über die vorliegenden Strukturen gibt [5]. Diese Technik ermöglicht die detaillierte perspektivische Darstellung der untersuchten Probe und wurde 2017 mit dem Nobelpreis in Chemie ausgezeichnet [225]. Für die erfolgreiche Darstellung der Abstände sind die Messungen mit einem ROXS-Puffer durchgeführt worden, um die Photonenausbeute zu erhöhen. Der in [11] genutzte *ATTO[®]655* benötigt hingegen keinen speziellen Messpuffer für die Auflösung eines Abstands von 6 nm. Um die Komplexität des Messpuffers gering zu gestalten, könnte *ATTO[®]655* für wiederholte Messungen anstelle des *STAR RED* eingesetzt werden.

Die designten Abstände wurden ebenfalls mit der FRET-Methode untersucht. Zu berücksichtigen ist die Durchführung beider Methoden an einem Weitfeld-Mikroskop, welches ursprünglich nur für die Superauflösung eingesetzt wurde. Dies wirkte sich aufgrund von konstruktionsbedingten Einschränkungen auf die Qualität der Daten aus. Zudem konnte

angedeutet werden, dass der *Abberior STAR RED* stark photoinduzierte Prozesse aufweist und dadurch für das bestehende System als ungeeigneter FRET-Akzeptor einzustufen ist. Vor diesem Hintergrund musste von einer quantitativen Auswertung der erhaltenen Messergebnisse abgesehen werden. Die Untersuchung der Fluoreszenzanisotropie kann Aufschluss über die durch das Design der Nanostruktur bedingte Einschränkung der freien Rotation des *Abberior STAR RED* geben [226] [227]. Qualitativ konnte der selbe Trend bezüglich der Verzerrung der Abstände wie bei der Superauflösung beobachtet werden. Es ist gezeigt worden, dass die Durchführung von FRET-Experimenten an einem für die Superauflösungsmikroskopie ausgelegten Weitfeld-Aufbau grundsätzlich zu realisieren ist. Zur besseren Beschreibung des Weitfeld-Mikroskops für FRET-Experimente sollten diese mit einem anderen und bereits etablierten FRET-Paar durchgeführt werden.

Zur quantitativen Korrelation der FRET- und DNA-PAINT-Abstände ist der *Abberior STAR RED* durch den *ATTO[®]647N* ersetzt worden. Mit integrierten Farbstoffen sind die Nanostrukturen erfolgreich am konfokalen Aufbau untersucht worden. Mit einer Abweichung von etwa jeweils 2 nm konnten die designte Abstände wieder gegeben werden. Die Abweichung vom Erwartungswert geht auf die Flexibilität der Linker zwischen DNA und Farbstoff und auf die spektrale Fluktuation der Akzeptorfarbstoffe durch die Flexibilität der Nanostruktur selbst zurück [205] [207]. Dennoch konnte eine Korrelation zwischen FRET und Superauflösungsmikroskopie hergestellt und die Lücke zwischen beiden Methoden geschlossen werden. Für die künftige Etablierung eines Weitfeld-Aufbaus für FRET-Messungen sollte weiterhin auf das etablierte FRET-Paar *ATTO[®]647N* und *ATTO[®]542* zurückgegriffen werden.

Mit einem solchen FRET-Paar kann die Durchführung von DNA-PAINT und FRET an derselben DNA-Origami Nanostruktur, um die Messmethoden direkt miteinander zu vergleichen und somit deren Rückführbarkeit zu ermöglichen, realisiert werden. Um identische Positionen auf dem DNA-Origami abzubilden, ist der in dieser Arbeit gezeigte Einsatz von *docking strands* sehr vielversprechend. Diese müssten für FRET-Messungen über eine entsprechende Länge verfügen, der die kurzen *docking strands* der DNA-PAINT-Methode gegenüberstehen. Ein theoretisches Konzept eines für beide Methoden kompatiblen Strangs stellt hierbei nicht die entscheidende Herausforderung dar. Denkbar wäre die Etablierung von zwei unterschiedlichen etwa 20 Nukleotide langen *docking strand*, die im unteren Abschnitt komplementär zum DNA-PAINT-Imager sind. Nach einem Spülschritt können die Farbstoffe entfernt und mit den FRET-Farbstoffen ersetzt werden. Die größte Problematik liegt aber in der Wiederholbarkeit der Messungen an der gleichen Nanostruktur. Nach der Durchführung der FRET Messung ist das erneute Entfernen der *Imager strands* aufgrund der starken Hybridisierung durch einfache Spülschritte wie bei DNA-PAINT-Messungen nicht möglich. Die Durchführung einer einzigen Messung an der selben Stelle ist für die Gewährleistung einer entsprechenden statistischen Erhebung der Messergebnisse nicht

ausreichend. Bedingt durch das externe Labeling ist die Anzahl an generierten FRET-Intensitätsspuren der betrachteten Position zu gering, um eine aussagekräftige Statistik zu erhalten. Da sich die permanent gebundenen Stränge nicht ohne weiteres Entfernen lassen und nach einer Messung wahrscheinlich geblieben sind, müsste die Aufnahmeregion verschoben werden. Dadurch werden andere Nanostrukturen untersucht, die ebenso keine ausreichende Ausbeute an Daten liefern können. Ein Lösungsaspekt ist der Einsatz kurzer *docking strands*, sodass die Farbstoffe an- und abbinden können. Dadurch gäbe es wie bei DNA-PAINT theoretisch kein Photobleichen und die identische Region könnte mehrmals vermessen werden. Dabei muss aber besonders die Bindekinetik beachtet werden. Die FRET-Farbstoffe müssen so lang gebunden sein, dass der Energieübertrag stattfinden kann. In ähnlicher Form ist dies bereits durch Auer et al. [133] und Lee et al. [228] publiziert worden. Auer et al. [133] haben erfolgreich einen Ansatz zur Erhöhung der Bildaufnahme von DNA-PAINT-Messungen vorgestellt, das FRET-basierte DNA-PAINT. Dazu wurden sowohl fixierte als auch transiente Akzeptorfarbstoffe mit transient bindenden Donorfarbstoffen kombiniert und zur Darstellung von Zellen und vier Spots auf einem DNA-Origami genutzt. Auer et al. nutzt einen langen *docking strand* an den sowohl der Akzeptor als auch der Donor in bestimmten Abschnitten binden können. Dabei zeigen die beiden Farbstoffmoleküle zu einander [133]. Die Dissoziationsraten der Stränge sind dabei unterschiedlich, um den Akzeptorstrang länger gebunden zu halten. Von großem Nachteil, der ebenfalls in dieser Arbeit beobachtet wurde, ist die begrenzte Wahrscheinlichkeit zur gleichen Zeit sowohl den Donor als auch den Akzeptor gebunden vor zu finden. Laut Berechnungen müsste eine *Imager*-konzentration von 72 nM vorliegen, die wiederum nicht zu qualitativ hochwertigen DNA-PAINT Daten führen würde. Die Nutzung transient bindender FRET-Paare stellt auch in [133] eine Herausforderung da. Eine elegante Lösung wurde durch den Einsatz eines mit dem Akzeptor markierten *docking strand*, an den der Donor binden kann, vorgestellt [133]. Für den in dieser Arbeit verfolgten Ansatz müsste der Akzeptor für die DNA-PAINT-Messung jedoch zum Blinken gebracht werden [8] [21]. Außerdem können diverse Farbstoffe nicht für die DNA-PAINT-Messung eingesetzt werden. *ATTO[®]647N* ist einer der meist genutzten Farbstoffe für FRET-Experimente auf Einzelmolekülebene. Aufgrund seiner vergleichsweise starken hydrophoben Eigenschaften und der verschiedenen spektralen Zustände ist er ungeeignet für die Abbildung von Strukturen durch DNA-PAINT [207].

Weitere Schwierigkeiten ergeben sich durch die technische Umsetzung. Das Weitfeldmikroskop ist für die aufeinanderfolgende Messung von FRET und DNA-PAINT zu optimieren. Die Umbaumaßnahmen sind vor der Durchführung der DNA-PAINT-Messung vorzunehmen, um Erschütterungen und Bewegungen der Probe zu vermeiden. Durch den Einsatz des *Opto-Split* gehen zusätzlich Photonen verloren, was die Superauflösung erschwert. Hier sollte entsprechendes optisches Equipment eingesetzt werden. Das erstrebenswerte Ziel,

FRET-Werte durch eine zuvor supraufgelöste Distanz an der gleichen Nanostruktur zu validieren, bleibt somit weiterhin bestehen.

Denkbar wäre die Einführung jeweiliger *docking strands* an unterschiedlichen Positionen. So erfolgt die Vermessung an der identischen Nanostruktur, jedoch kann die Position in Abhängigkeit des Nanostrukturdesigns und der Pufferzusammensetzungen unterschiedlich stark beeinflusst werden. Eine weitere Überlegung wäre der Einsatz eines zusätzlich in der Nanostruktur integrierten FRET-Paares anstelle von *docking strands*. Die angestrebte Vermessung der gleichen Position an identischer Nanostruktur kann so allerdings nicht umgesetzt werden.

Ein weiterer Ansatz wäre die Nutzung eines in der Nanostruktur integrierten FRET-Paares aus grünen beziehungsweise gelben Farbstoffen, um diese bei Einsatz des roten Lasers für die Superauflösung nicht zu bleichen. Entsprechende Paare wurden bereits in der Literatur beschrieben [229] [230] [207]. Hinsichtlich dieses Ansatzes können beispielsweise sogenannte *molecular photonic wires* genutzt werden. Diese „Kabel“ auf Basis von DNA-Origami Nanostrukturen sind mit mehreren unterschiedlichen Farbstoffmolekülen versehen. Dabei handelt es sich je um ein bis zwei Donor- und Akzeptormoleküle, welche sich allerdings nicht in unmittelbarer Nähe zu einander befinden. Zwischen Donor und Akzeptor befindet sich eine bestimmte Anzahl identischer Farbstoffe, zwischen denen Energie ebenfalls strahlungslos übertragen werden kann (der sogenannte *HomoFRET*). Durch die Nutzung des *HomoFRET* kann die Energieübertragung über weite Strecken erfolgen [231] und damit die Möglichkeit geben, größere Abstände auf der DNA-Origami Nanostruktur als Referenzen einzusetzen [43] [51] [232]. In weiterführenden Projekten kann die Durchführung von FRET-Experimenten an einem Weitfeldaufbau sowie an der gleichen Nanostruktur weiter fokussiert werden.

Darüber hinaus zeigt diese Arbeit, dass selbstassemblierte DNA-Origami Nanostrukturen genutzt werden können, um biologische Strukturen mittels Superauflösungsmikroskopie darzustellen. Einzelne HFQ-Proteine wurden dazu mit einzelsträngiger DNA modifiziert und jeweils gerichtet auf eine Nanostruktur gebunden. Dies ist sowohl durch AFM und DNA-PAINT Messungen verifiziert worden. Das Protein wurde durch diese Methode größer abgebildet (10 nm bis 30 nm), als es in Wirklichkeit ist (6 nm). So konnte eine sonst schwierig aufzulösende Struktur in einem besser auflösbaren Bereich abgebildet werden. Die Abstände markanter Positionen sowie die allgemeine hexagonale Form des HFQ-Proteins konnten entsprechend der Theorie erfolgreich wieder gegeben werden. Der Einsatz von DNA-PAINT verfügt im Vergleich zu anderen Mikroskopietechniken über eine hohe Biokompatibilität und Resistenz gegenüber Photobleichen, wodurch sie eine vielversprechende Anwendung für die Betrachtung von biologischen Systemen mit höchster Präzision darstellt [52].

Nachteilig ist die Unwissenheit um die Anzahl der an das Protein gekoppelten DNA-Stränge.

Durch die einfache Veränderlichkeit der DNA-Sequenzen könnte ein zusätzlicher Marker am 5'-Ende der proteingekoppelten DNA angebracht werden, der die Beobachtung von Bleichschritten ermöglicht. Die Anzahl der Bleichschritte würde Auskunft über die proteingebundenen Stränge geben und ließe sich mit der für diese Struktur supraaufgelösten Spots vergleichen. Die Auswirkung der eingesetzten Poly-T-Linker hinsichtlich der dadurch wirkenden Flexibilität der Anbindeposition oder Kraft ist ebenfalls nicht eindeutig geklärt. Genauer könnte die Auswirkung einer angelegten Kraft auf das Protein mit Hilfe einer molekularen Kraftwaage, der sogenannten *Force clamp*, untersucht werden [233]. Durch die so mögliche kontrollierte Krafteinwirkung und Vermessung durch DNA-PAINT oder FRET können Abstandsänderungen im Protein erfasst und auf das in dieser Arbeit gezeigte System übertragen werden.

Die Nutzung von DNA-PAINT Anbindestellen erlaubt die Abstandsmessung im biomolekular relevanten Bereich weniger Nanometer und gewährt biologischen Proben somit Zugang zum Feld der Superauflösung. Die Detektion einzelner Moleküle, die Strukturanalyse oder die Betrachtung dynamischer Prozesse in einer bestimmten Untereinheit wären weitere mögliche Forschungsansätze. Aufgrund der Fähigkeit des HFQ-Proteins RNA zu binden, ist es wünschenswert, konkrete bildgebende Methoden zu etablieren. Eine Verankerung des HFQ-DNA-Origamis in Null-Moden-Lichtleitern (*zero mode wave guides*) zur Echtzeit-Betrachtung der Transkriptionsprozesse wäre ein Beispiel [173] [234]. Da es gängige Praxis ist DNA-Origami Nanostrukturen und Proteine in gleichem Maß mit diversen Molekülen [48], Partikeln [50] und Naturstoffen [235] zu modifizieren, ist ein durchaus visionärer Ansatz die Nutzung eines Protein/Medikamenten-DNA-Origami Komplexes für die gezielte Medikation. Die Nanostruktur könnte gezielt mit spezifischen Zellen interagieren, in diese eindringen und das Protein/Medikament an der betroffenen Region frei setzen.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist die erweiterte, aber exakte Darstellung einer Proteinstruktur durch DNA-PAINT eine elegante biokompatible Lösung. Diesbezüglich ist ein ansehnlicher Ausgangspunkt für weitere methodische Entwicklungen erreicht worden.

A Anhang

A.1 *caDNAno*

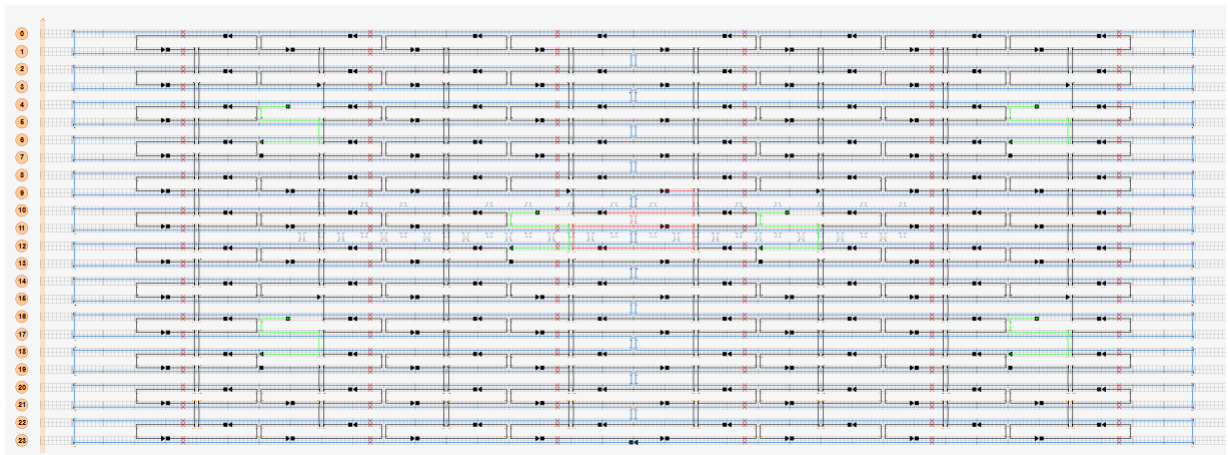


Abbildung A.1: *caDNAno* Oberfläche des in dieser Arbeit genutzten DNA-Origamis. Rot gefärbte Stränge zeigen jene, deren 3'-Ende (Pfeilspitze) um eine bestimmte Sequenz für das jeweilige Experiment verlängert wird. Grün dargestellt sind die Stränge, die ein Biotin am 5'-Ende (Rechteck) tragen. In schwarz sind die unveränderten *staple strands* gezeigt. Die blauen Linien repräsentieren den Scaffold.

Abbildung A.1 zeigt das vollständige in dieser Arbeit verwendete Design in *caDNAno*. Im linken und rechten äußeren Bereich des aus diesem Design entstehenden NRO sind jeweils zwei Biotin-modifizierte Stränge integriert (dargestellt in grün). Zusätzlich finden sich zwei Biotine in zentraler Position der Nanostruktur. Zwischen diesen Biotinen sind die Verlängerungen für die jeweiligen DNA-PAINT und FRET-Experimente positioniert worden (dargestellt in rot). Unveränderte Stränge erscheinen schwarz, der Scaffold ist als blaue Linie gezeigt. Die ursprüngliche *caDNAno* Datei findet sich in [49].

Der schematische Ausschnitt des Designs für die Immobilisierung des HFQ-Proteins auf der DNA-Origami Nanostruktur ist in der folgenden Abbildung A.2 gezeigt.

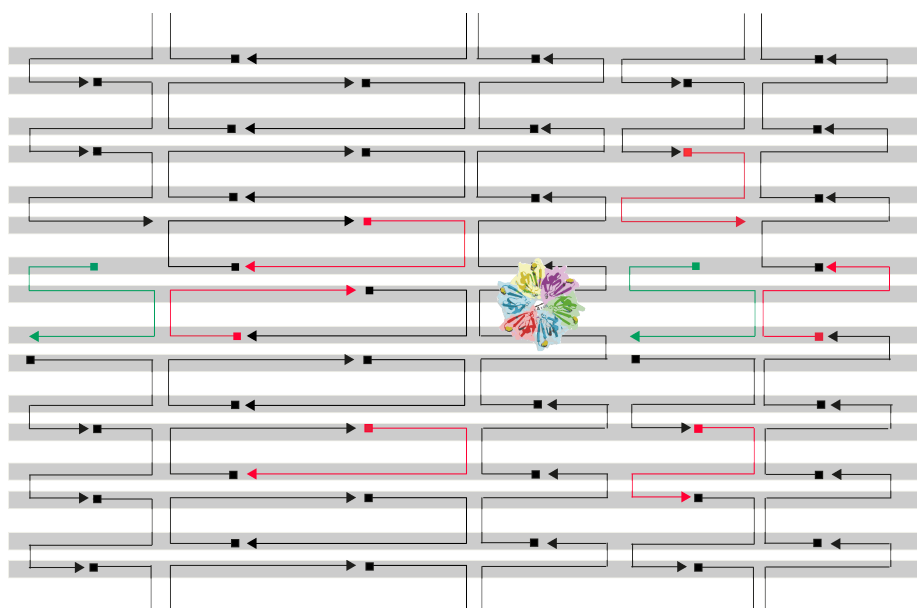


Abbildung A.2: Design des NRO zur Proteinbindung in *caDNAno*. Rot gefärbte Stränge zeigen jene, deren 3'-Ende (Pfeilspitze) um eine bestimmte Sequenz verlängert wird. Grün dargestellt sind die Stränge, die ein Biotin am 5'-Ende (Rechteck) tragen. In schwarz sind die unveränderten *staple strands* gezeigt. In grau sind die Helices gezeigt, welche zur vereinfachten Darstellung des *Scaffold* in *caDNAno* verwendet werden. In zentraler Position ist schematisch das HFQ-Protein gezeigt.

Abbildung A.2 zeigt schematisch den in dieser Arbeit verwendeten Ausschnitt des Designs in *caDNAno*. Die Verlängerungen zur Immobilisierung des HFQ-Proteins (dargestellt in rot) sind zwischen den beiden zentral positionierten Biotin-Modifikationen (dargestellt in grün) angebracht. Unveränderte Stränge erscheinen schwarz, der *Scaffold* ist als graue Helix zur vereinfachten Darstellung gezeigt.

A.2 Sequenzen der NRO-Stränge

In diesem Teil werden die genutzten DNA-Oligonukleotid-Sequenzen aufgelistet, welche zur Herstellung des NRO verwendet wurden. Alle Oligos wurden in einer Konzentration von 100 pM/μL von **eurofins Genomics** bezogen. Zunächst sind die unmodifizierten Stränge in folgender Tabelle gezeigt.

Tabelle A.1: Sequenzen der unmodifizierten NRO-Stränge

Nummer	Sequenz (5'-Ende nach 3'-Ende)
1	ATTATACTAAGAAACCACCAGAAGTCAACAGT
2	CAACCGTTTCAAATCACCATCAATTTCGAGCCA

3	GCCCTTCAGAGTCCACTATTAAAGGGTGCCGT
4	TGTAGCCATTAAAATTTCGCATTAAATGCCGGA
5	GTTTATTTTGTGTCACAATCTTACCGAAGCCCTTTAATATCA
6	CAACTGTTGCGCCATTTCGCCATTCAAACATCA
7	TTAGGATTGGCTGAGACTCCTCAATAACCGAT
8	TTTTCACTCAAAGGGCGAAAAACCATCACC
9	CATGTAATAGAATATAAAGTACCAAGCCGT
10	GCGCAGACAAGAGGCAAAAGAATCCCTCAG
11	ACCCTTCTGACCTGAAAGCGTAAGACGCTGAG
12	TAGGTAAACTATTTTTTGAGAGATCAAACGTTA
13	TATAACTAACAAAGAACGCGAGAACGCCAA
14	CGTAAACAGAAATAAAAAATCCTTTGCCCGAAAGATTAGA
15	CCTAAATCAAAATCATAGGTCTAAACAGTA
16	AGACGACAAAGAAGTTTTGCCATAATTCGAGCTTCAA
17	TTAACACCAGCACTAACAATAATCGTTATTA
18	TGGAACAACCGCCTGGCCCTGAGGCCCGCT
19	TATTAAGAAGCGGGGTTTTGCTCGTAGCAT
20	TCCACAGACAGCCCTCATAGTTAGCGTAACGA
21	CCACCCTCATTTTTCAGGGATAGCAACCGTACT
22	CGATAGCATTGAGCCATTTGGGAACGTAGAAA
23	AATACTGCCCAAAGGAATTACGTGGCTCA
24	TAAATCGGGATTCCCAATTCTGCGATATAATG
25	GCGAACCTCCAAGAACGGGTATGACAATAA
26	ATCCCAATGAGAATTAACCTGAACAGTTACCAG
27	TTCTACTACGCGAGCTGAAAAGGTTACCGCGC
28	GATGGTTTGAACGAGTAGTAAATTTACCATTA
29	AACAAGAGGGATAAAAAATTTTTAGCATAAAGC
30	TCAATATCGAACCTCAAATATCAATTCCGAAA
31	CTGTAGCTTGACTATTATAGTCAGTTCATTGA
32	ATACCCAACAGTATGTTAGCAAATTAGAGC
33	TCACCAGTACAACTACAACGCCTAGTACCAG
34	ATATTTTGGCTTTCATCAACATTATCCAGCCA
35	GCCTTAAACCAATCAATAATCGGCACGCGCCT
36	TTTATCAGGACAGCATCGGAACGACACCAACCTAAAACGA
37	CCAACAGGAGCGAACCAGACCGGAGCCTTTAC
38	GCGGATAACCTATTATTCTGAAACAGACGATT

39	TTAACGTCTAACATAAAAAACAGGTAACGGA
40	AAGTAAGCAGACACCACGGAATAATATTGACG
41	TACCGAGCTCGAATTCGGGAAACCTGTCGTGCAGCTGATT
42	TCACCGACGCACCGTAATCAGTAGCAGAACCG
43	CTTTTGCAGATAAAAAACCAAAATAAAGACTCC
44	TTAGTATCACAATAGATAAGTCCACGAGCA
45	AATTGAGAATTCTGTCCAGACGACTAAACCAA
46	GCCTCCCTCAGAATGGAAAGCGCAGTAACAGT
47	ACAAACGGAAAAGCCCCAAAAACACTGGAGCA
48	CAGCAAAAGGAAACGTCACCAATGAGCCGC
49	AAAGCACTAAATCGGAACCCCTAATCCAGTT
50	GCACAGACAATATTTTTGAATGGGGTCAGTA
51	AAATCACCTTCCAGTAAGCGTCAGTAATAA
52	GACCTGCTCTTTGACCCCCAGCGAGGGAGTTA
53	AAGGAAACATAAAGGTGGCAACATTATCACCG
54	TTAATGAACTAGAGGATCCCCGGGGGGTAACG
55	CGGATTGCAGAGCTTAATTGCTGAAACGAGTA
56	AACAGTTTTGTACCAAAAACATTTTATTTTC
57	GTACCGCAATTCTAAGAACGCGAGTATTATTT
58	TTTAGGACAAATGCTTTAAACAATCAGGTC
59	GATTTAGTCAATAAAGCCTCAGAGAACCCTCA
60	GCGAAAAATCCCTTATAAATCAAGCCGGCG
61	AATAGCTATCAATAGAAAATTCAACATTCA
62	GTCGACTTCGGCCAACGCGCGGGGTTTTTC
63	TAATCAGCGGATTGACCGTAATCGTAACCG
64	ATATTCGGAACCATCGCCCACGCAGAGAAGGA
65	GCAATTCACATATTCCTGATTATCAAAGTGTA
66	TAAATCAAAATAATTCGCGTCTCGGAAACC
67	AGCAAGCGTAGGGTTGAGTGTTGTAGGGAGCC
68	AGCGCGATGATAAATTGTGTCGTGACGAGA
69	TTTACCCCAACATGTTTTAAATTTCCATAT
70	GCAAGGCCTCACCAGTAGCACCATGGGCTTGA
71	CTGTGTGATTGCGTTGCGCTCACTAGAGTTGC
72	CTCCAACGCAGTGAGACGGGCAACCAGCTGCA
73	AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAACCAGTAA
74	CTTTAGGGCCTGCAACAGTGCCAATACGTG

75	ACCGATTGTCTGGCATTTCGGTCATAATCA
76	AAACAGCTTTTTTGCGGGATCGTCAACACTAAA
77	GCCATCAAGCTCATTTTTTTAACCACAAATCCA
78	CACAACAGGTGCCTAATGAGTGCCCAGCAG
79	CGCGCAGATTACCTTTTTTTAATGGGAGAGACT
80	GTAATAAGTTAGGCAGAGGCATTTATGATATT
81	CATAAATCTTTGAATACCAAGTGTTAGAAC
82	CTCGTATTAGAAATTGCGTAGATACAGTAC
83	AGCCAGCAATTGAGGAAGGTTATCATCATTTT
84	TCAAGTTTCATTAAAGGTGAATATAAAAGA
85	CAGAAGATTAGATAATACATTTGTCGACAA
86	TAAATGAATTTTCTGTATGGGATTAATTTCTT
87	CATCAAGTAAAACGAACTAACGAGTTGAGA
88	TCATTCAGATGCGATTTTAAGAACAGGCATAG
89	GTATAGCAAACAGTTAATGCCCAATCCTCA
90	GTTTTAACTTAGTACCGCCACCCAGAGCCA
91	ACGCTAACACCCACAAGAATTGAAAATAGC
92	AATGGTCAACAGGCAAGGCAAAGAGTAATGTG
93	CTGAGCAAAAATTAATTACATTTTGGGTTA
94	ATTATCATTCAATATAATCCTGACAATTAC
95	AAAGTCACAAAATAAACAGCCAGCGTTTTA
96	AGTATAAAGTTCAGCTAATGCAGATGTCTTTC
97	AACGCAAAATCGATGAACGGTACCGGTTGA
98	TTTCGGAAGTGCCGTCGAGAGGGTGAGTTTCG
99	GATGGCTTATCAAAAAGATTAAGAGCGTCC
100	CAGCGAACTTGCTTTTCGAGGTGTTGCTAA
101	AATACGTTTGAAAGAGGACAGACTGACCTT
102	TTGACAGGCCACCACCAGAGCCGCGATTTGTA
103	GCCCGAGAGTCCACGCTGGTTTGCAGCTAACT
104	CAAATCAAGTTTTTTTGGGGTCGAAACGTGGA
105	TTTTATTTAAGCAAATCAGATATTTTTTGT
106	CCACCCTCTATTCACAAACAAATACCTGCCTA
107	GATGTGCTTCAGGAAGATCGCACAAATGTGA
108	CCAGGGTTGCCAGTTTGAGGGGACCCGTGGGA
109	AACACCAAATTTCAACTTTAATCGTTTACC
110	AAGCCTGGTACGAGCCGGAAGCATAGATGATG

111	GAATTTATTTAATGGTTTGAAATATTCTTACC
112	TTATTACGAAGAACTGGCATGATTGCGAGAGG
113	TCTAAAGTTTTGTCTGCTTTTCCAGCCGACAA
114	GCGGAACATCTGAATAATGGAAGGTACAAAAT
115	AATAGTAAACACTATCATAACCCTCATTGTGA
116	CTTTTACAAAATCGTCGCTATTAGCGATAG
117	ATTTTAAAATCAAAATTATTTGCACGGATTCTG
118	ATCCCCCTATACCACATTCAACTAGAAAAATC
119	CGAAAGACTTTTGATAAGAGGTCATATTTTCGCA
120	GCTATCAGAAATGCAATGCCTGAATTAGCA
121	CTTAGATTTAAGGCGTTAAATAAAGCCTGT
122	TCATCGCCAACAAAGTACAACGGACGCCAGCA
123	TTATACCACCAAATCAACGTAACGAACGAG
124	GCTTTCCGATTACGCCAGCTGGCGGCTGTTTC
125	TACGTTAAAGTAATCTTGACAAGAACCGAACT
126	CACATTAAAATTGTTATCCGCTCATGCGGGCC
127	GCCGTCAAAAAACAGAGGTGAGGCCTATTAGT
128	GCGAGTAAAAATATTTAAATTGTTACAAAG
129	GGCCTTGAAGAGCCACCACCCTCAGAAACCAT
130	AGAAAGGAACAACCTAAAGGAATTCAAAAAAA
131	AAATTAAGTTGACCATTAGATACTTTTGCG
132	ATGCAGATACATAACGGGAATCGTCATAAATAAAGCAAAG
133	CATTTGAAGGCGAATTATTCATTTTTTGTTTGG
134	GCCCGTATCCGGAATAGGTGTATCAGCCCAAT
135	GACAAAAGGTAAAGTAATCGCCATATTTAACAAAACCTTTT
136	ACAACATGCCAACGCTCAACAGTCTTCTGA
137	TAAAAGGGACATTCTGGCCAACAAAGCATC
138	AGAAAACAAAGAAGATGATGAAACAGGCTGCG
139	TTCCAGTCGTAATCATGGTCATAAAAGGGG
140	AACGCAAAGATAGCCGAACAAACCCTGAAC
141	TTAAAGCCAGAGCCGCCACCCTCGACAGAA
142	ACCTTGCTTGGTCAGTTGGCAAAGAGCGGA
143	CACCAGAAAGGTTGAGGCAGGTCATGAAAG
144	TTGCTCCTTTCAAATATCGCGTTTGAGGGGGT
145	CAGGAGGTGGGGTCAGTGCCTTGAGTCTCTGAATTTACCG
146	ATACATACCGAGGAAACGCAATAAGAAGCGCATTAGACGG

147	CTTATCATTCCCGACTTGCGGGAGCCTAATTT
148	TGTAGAAATCAAGATTAGTTGCTCTTACCA
149	CCTGATTGCAATATATGTGAGTGATCAATAGT
150	TAAATCATATAACCTGTTTAGCTAACCTTTAA
151	ACCTTTTTTATTTTAGTTAATTTTCATAGGGCTT
152	GAAATTATTGCCTTTAGCGTCAGACCGGAACC
153	GTTTATCAATATGCGTTATACAAACCGACCGTGTGATAAA
153	TCTTCGCTGCACCGCTTCTGGTGCGGCCTTCC
154	AGGCTCCAGAGGCTTTGAGGACACGGGTAA
155	AGGAACCCATGTACCGTAACACTTGATATAA
156	TCGGCAAATCCTGTTTGATGGTGGACCTCAA
157	TAAGAGCAAATGTTTAGACTGGATAGGAAGCC
158	CTACCATAGTTTGAGTAACATTTAAAATAT
159	ACACTCATCCATGTTACTTAGCCGAAAGCTGC
160	AAGGCCGCTGATACCGATAGTTGCGACGTTAG
161	AGGCAAAGGGAAGGGCGATCGGCAATTCCA
162	GACCAACTAATGCCACTACGAAGGGGGTAGCA
163	TGACAACTCGCTGAGGCTTGCATTATACCA
164	CCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAAAGAATA
165	ACAACCTTCAACAGTTTCAGCGGATGTATCGG
166	CTTTAATGCGCGAACTGATAGCCCCACCAG
167	GAGAGATAGAGCGTCTTTCCAGAGGTTTTGAA
168	ACGGCTACAAAAGGAGCCTTTAATGTGAGAAT
169	TGAAAGGAGCAAATGAAAAATCTAGAGATAGA
170	AAAGGCCGGAGACAGCTAGCTGATAAATTAATTTTTGT
171	TCAAATATAACCTCCGGCTTAGGTAACAATTT
172	TATATTTTGTTCATTGCCTGAGAGTGGAAGATTGTATAAGC
173	ATTACCTTTGAATAAGGCTTGCCCCAATCCGC
174	GAGGGTAGGATTCAAAAGGGTGAGACATCCAA
175	GCCAGTTAGAGGGTAATTGAGCGCTTTAAGAA
176	TGCATCTTTCCCAGTCACGACGGCCTGCAG

Um das NRO auf der passivierten Oberfläche zu befestigen, sind folgende Biotin-modifizierten Sequenzen eingesetzt worden:

Tabelle A.2: Sequenzen der Biotin modifizierten Stränge

Oligo Nummer	Sequenz (5'-Ende nach 3'-Ende)
1	Biotin-CGGATTCTGACGACAGTATCGGCCGCAAGGCGATTAAGTT
2	Biotin-AGCCACCACTGTAGCGCGTTTTCAAGGGAGGGAAGGTAAA
3	Biotin-GAGAAGAGATAACCTTGCTTCTGTTCTGGGAGAAACAATAA
4	Biotin-ATAAGGGAACCGGATATTCATTACGTCAGGACGTTGGGAA
5	Biotin-TAGAGAGTTATTTTCATTTGGGGATAGTAGTAGCATTAA
6	Biotin-GAAACGATAGAAGGCTTATCCGGTCTCATCGAGAACAAGC

Tabelle A.2 zeigt die Sequenzen, die ein Biotin an ihrem 5'-Ende tragen. Diese Stränge werden den in Tabelle A.1 gelisteten Oligonukleotid-Sequenzen hinzugegeben.

Für die DNA-PAINT Messungen werden für die jeweiligen Abstände folgende Oligonukletide im DNA-Origami platziert. Dazu werden diese wie die Biotine zu den unmodifizierten Strängen hinzugegeben. Für jeden Abstand ist eine eigene Nanostruktur hergestellt worden. Die entsprechende Verlängerung ist jeweils durch Aufteilung in drei Nukleotide hervor gehoben:

PAINT 5,9 nm ohne crossover

5'-TTCTACTACGCGAGCTGAAAAGGTTACCGCGC TTA AAT GCC CG-3'
 5'-AGAGAGAAAAAAATGAAAATAGCAAGCAAAC TTA AAT GCC CG-3'

PAINT 6 nm

5'-AGAGAGAAAAAAATGAAAATAGCAAGCAAAC TTA AAT GCC CG -3'
 5'-CCAATAGCTCATCGTAGGAATCATGGCATCAA TTA AAT GCC CG-3'

PAINT 5,9 nm mit crossover

5'-AGAGAGAAAAAAATGAAAATAGCAAGCAAAC TTA AAT GCC CG-3'
 5'-CCAACAGGAGCGAACCAGACCGGAGCCTTTAC TTA AAT GCC CG-3'

Der **DNA-PAINT Imager**, welcher an die modifizierten *docking strands* hybridisiert, besteht aus folgenden Nukleotiden:

5'-CGG GCA TTT A-3'-*Abberior STAR RED*

Für die FRET Messungen werden für die jeweiligen Abstände folgende Oligonukletide im DNA-Origami platziert:

FRET 5,9 nm ohne crossover

5'-TTCTACTACGCGAGCTGAAAAGGTTACCGCGC TTT TCC TCT ACC ACC TAC
ATC AC-3'

5'-AGAGAGAAAAAAATGAAAATAGCAAGCAAAC TTT TTT TTT TTT TTT TTT
TTT TT-3'

FRET 6 nm

5'-CCAATAGCTCATCGTAGGAATCATGGCATCAA TTT TTT TTT TTT TTT TTT
TTT TT-3'

5'-AGAGAGAAAAAAATGAAAATAGCAAGCAAAC TTT TCC TCT ACC ACC TAC
ATC AC-3'

FRET 5,9 nm mit crossover

5'-AGAGAGAAAAAAATGAAAATAGCAAGCAAAC TTT TCC TCT ACC ACC TAC
ATC AC-3'

5'-CCAACAGGAGCGAACCAGACCGGAGCCTTTAC TTT TTT TTT TTT TTT TTT
TTT TT-3'

Diese Sequenzen werden für jeden Abstand den unmodifizierten und den Biotin-Strängen zugegeben.

Die jeweiligen FRET Imager, welche an die modifizierten *docking strands* hybridisieren, bestehen auf folgenden Nukleotiden:

5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA -3'-*Abberior STAR RED*

5'-GTG ATG TAG GTG GTA GAG GAA-3'- *ATTO[®]542*

Die farbstoffmarkierten Stränge, die fest mit der Nanostruktur verbunden und für die Lösungsmessung verwendet wurden, lauten:

5'-CCA ATA GCT CAT CGT AGG AAT CAT GGC ATC AAT T-3'- *ATTO[®]647N*

5'-AGA GAG AAA AAA ATG AAA ATA GCA AGC AAA CTT T-3'-*ATTO[®]542*

5'-TTC TAC TAC GCG AGC TGA AAA GGT TAC CGC GCT T-3'- *ATTO[®]647N*

bzw *ATTO[®]542* (die Modifikation ist entsprechend der Akzeptor- bzw. Donormodifikation gewählt worden)

Die im DNA-Origami befindlichen Stränge, um das HFQ-Protein einzufangen beziehungsweise auf der Nanostruktur zu halten, sind in folgender Tabelle A.3 gelistet.

Tabelle A.3: Sequenzen zur Protein-Immobilisierung

Position	Sequenz (5'-Ende zu 3'-Ende)
1 (<i>capturing strand</i>)	TTT CGG ACT GCA CAT TAT AAA TTTT TTTT TTTT CTACTACGCGAGCTGAAAAGGTTACCGCGC
2	GCA CAT TAT AAA TTTT TTTT TTTT AGAGA-GAAAAAATGAAAATAGCAAGCAAAC
3	GCA CAT TAT AAA TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT ATACATACCGAGGAAACGCAATAAGAAGCGCAT-TAGACGG
4	GCA CAT TAT AAA TTTT TTTT GTACCGCAATTCTAA-GAACGCGAGTATTATTT
5	GCA CAT TAT AAA TTTT CAAATATAACCTCCG-GCTTAGGTAACAATTT
6	GCA CAT TAT AAA TTTT ATCGCAAGTATGTAAAT-GCTGATGATAGGAAC

Die in Tabelle A.3 gelisteten Stränge interagieren sowohl mit den an das Protein gekoppelten Sequenzen als auch mit dem *Imager*.

Für die Visualisierung des HFQ-Protein ist an dieses per Click-Chemie zunächst folgende Sequenz gekoppelt worden:

5' ATA CAT CTA GTT TTT ATA ATG TGC AGT CCG AAA -3' DBCO

Der *Imager* für die DNA-PAINT-Messung besteht auf folgenden Nukleotiden:

5'-CTA GAT GTA T-3' -*ATTO*[®]655

Für die Kolokalisation ist das NRO an seiner kurzen Seite mit zehn Verlängerungen bestückt. Diese sind in folgender Tabelle A.4 gelistet.

Tabelle A.4: Sequenzen der Kolokalisationsstränge

Nummer	Sequenz (5'-Ende zu 3'-Ende)
1	GACCAACTAATGCCACTACGAAGGGGGTAGCA TTT TCC TCT ACC ACC TAC ATC AC
2	CTCCAACGCAGTGAGACGGGCAACCAGCTGCA TTT TCC TCT ACC ACC TAC ATC AC
3	TTAATGAACTAGAGGATCCCCGGGGGGTAACG TTT TCC TCT ACC ACC TAC ATC AC
4	ATCCCCCTATACCACATTCAACTAGAAAAATC TTT TCC TCT ACC ACC TAC ATC AC
5	ACAAACGGAAAAGCCCCAAAAACACTGGAGCA TTT TCC TCT ACC ACC TAC ATC AC
6	AACAAGAGGGATAAAAATTTTTAGCATAAAGC TTT TCC TCT ACC ACC TAC ATC AC
7	CCAGGGTTGCCAGTTTGAGGGGACCCGTGGGA TTT TCC TCT ACC ACC TAC ATC AC
8	TACGTAAAGTAATCTTGACAAGAACCGAAC TTT TCC TCT ACC ACC TAC ATC AC
9	TAAATCGGGATTCCCAATTCTGCGATATAATG TTT TCC TCT ACC ACC TAC ATC AC
10	CTGTAGCTTGACTATTATAGTCAGTTCATTGA TTT TCC TCT ACC ACC TAC ATC AC

Der komplementäre grün-markierte Strang besteht aus folgender Sequenz:

5'-GTG ATG TAG GTG GTA GAG G -3'-*ATTO*[®]542

A.3 Genutzte Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in folgender Tabelle A.5 gelistet.

Tabelle A.5: genutzte Chemikalien

Name	Hersteller
phosphate buffered saline (PBS)	sigma aldrich
Glucose	sigma aldrich
Katalase	sigma aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	alfa Aesar
Biozym-Gold Agarose	Biozym
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	sigma aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	sigma aldrich
biotinyliertes (BSA-Biotin	sigma aldrich
NeutrAvidin	sigma aldrich
Flusssäure (HF)	Merck
Polyethylenglykol PEG	sigma aldrich
Methylviologen MV	sigma aldrich
Ascorbinsäure AA	sigma aldrich
BlueJuice	invitrogen
peqGreen	peqLab

Die Zusammensetzung einzelner Puffer ist in folgender Tabelle A.6 dargestellt. Sofern nicht anderes angegeben, sind alle Puffer in Reinstwasser (MilliQ-Wasser) angesetzt.

Tabelle A.6: Zusammensetzung der genutzten Puffer

Puffer	Bestandteile
PBS	1,98 mM KH_2PO_4 10 mM Na_2HPO_4 2,7 mM KCl 137 mM NaCl
TAE	40 mM TRIS 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA 12 mM MgCl_2 300 mM NaCl
PEG	1 x TAE 12 mM MgCl_2 12 % 8000 PEG 500 mM NaCl

Glucoseoxidase/Katalase (GLOX)	1 mg/mL Glucoseoxidase 0,4 % (v/v) Katalase 30 % Glycerol 12,5 mM KCl in 50 mM TRIS
DNA-Origami Faltungspuffer	10 x TAE 120 mM MgCl ₂
Laufpuffer für Gele	0,5 x TAE 11 mM MgCl ₂
DNA-PAINT Imaging (NRO) in PBS	10 nM Imager 10 mM MgCl ₂ 1 nM MV 1 nM AA 1 % (w/v) Glucose in PBS 100 µL GLOX
DNA-PAINT Imaging (Protein) in Reinstwasser	10 nM Imager 25 mM TRIS/HCl (pH 7,5) 200 mM NaCl 10 mM MgCl ₂
FRET Imaging in PBS	10 nM Imager 10 mM MgCl ₂

A.4 Komponenten zu Hybridisierung, Herstellung, Aufreinigung und Vermessung eines DNA-Origamis

Für die Herstellung des NRO werden die in Tabelle A.1 unmodifizierten Stränge genutzt, welche in zwei Platten mit jeweils 96 und 90 Oligos bezogen werden. Um diverse Modifikationen in das NRO einzufügen, wird eine entsprechende Anzahl an unmodifizierten Oligos bei der Herstellung eines sogenannten **MasterMix** (MM) durch funktionalisierte Oligos ersetzt. Für den MM der beiden Platten werden je 10 μL der Oligos jeweils in Reaktionsgefäße überführt. Die MM enthalten lediglich die nicht modifizierten *staple strands*. Die *staple strands* mit Biotin und den Verlängerungen (*docking strands*) für die jeweilige Messmethode werden in gesonderten Reaktionsgefäßen angesetzt. Die eingesetzten Mengen sind in folgender Tabelle A.7 aufgelistet.

Tabelle A.7: Rezeptur NRO

Bezeichnung	Eingesetzte Menge
MM P1	10 μL
MM P2	10 μL
Scaffold	10 μL
Verlängerungen	4 μL
Biotin	2 μL
10x TAE mit 120 mM MgCl_2	4 μL

Die Komponenten aus Tabelle A.7 werden in einem Thermocycler durch folgendes Programm *JS2* hergestellt:

- Aufheizen des Gerätes auf 70 °C
- Temperatur wird für 5 Minuten konstant gehalten
- Schrittweise Abkühlen von 70 °C auf 20 °C mit 1 °C pro Minute
- Probe wird bei 20 °C bis zur Entnahme gelagert

A.5 PNAS Permission

Die Erlaubnis der Nutzung der in Kapitel 4.2.1 gezeigten Abbildung aus [163] wurde per E-Mail Verkehr mit PNAS eingeholt. Der Schriftverkehr ist in Abbildung A.3 gezeigt.

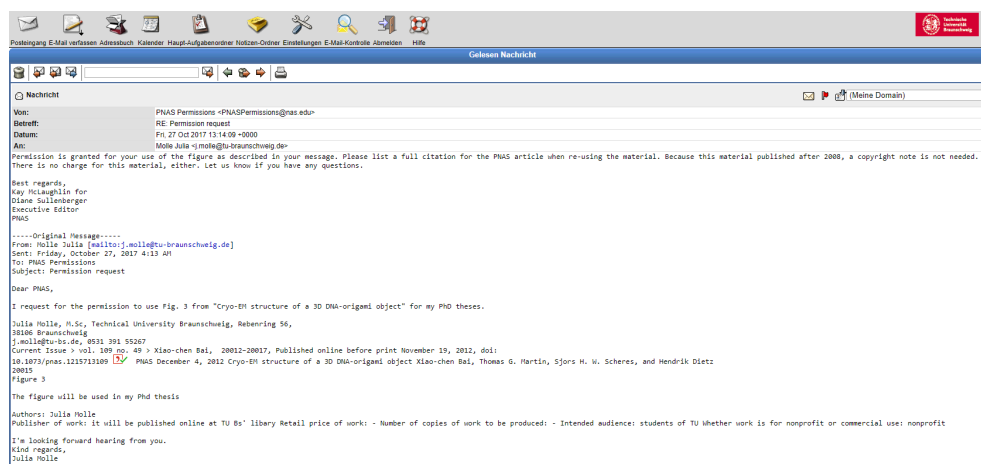


Abbildung A.3: Permission der Nutzung von Figure 3 aus [163]. Die Permission wurde per E-Mail erteilt.

A.6 Geradengleichung zur Bestimmung der Korrekturfaktoren

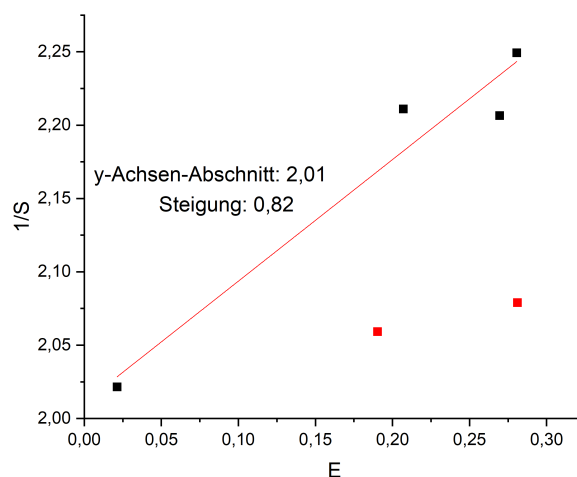


Abbildung A.4: Geradengleichung zur Bestimmung von γ und β . Die Mittelpunkte aller Hauptpopulationen wurden bestimmt und als Reziproke des Stöchiometriefaktors über die Übertragungseffizienz aufgetragen. Nicht berücksichtigt wurden die Werte der Abstandspalten von 5,9 nm jeweils mit und ohne crossover.

A.7 Reproduktion der Lösungsmessung

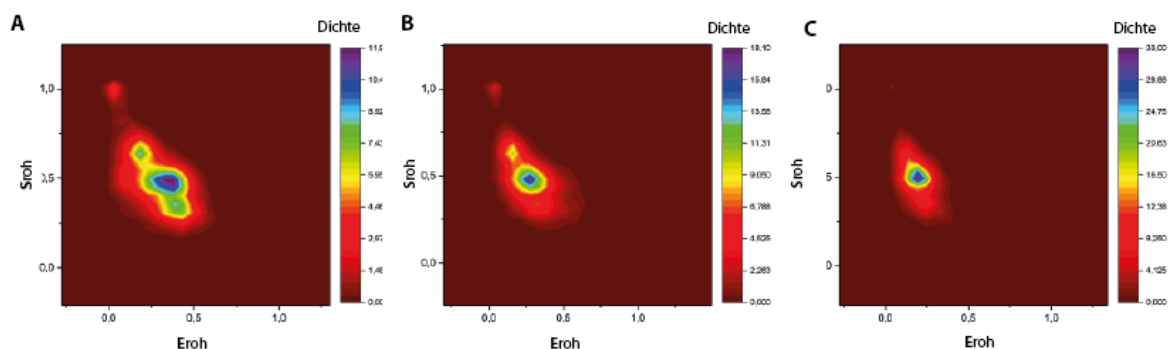


Abbildung A.5: Reproduktion der Lösungsmessung. Die Abstandsproben sind zur Findung und Validierung der optimalen Messbedingungen mehrfach vermessen worden. Bei den in Kapitel 4.3.4 beschriebenen Messbedingungen konnten die dortigen Beobachtungen wiedergegeben werden. Das Auftreten unterschiedlicher Populationen ist somit nicht auf Verunreinigungen oder Defekte in den Nanostrukturen zurückzuführen, sondern ist ein design-beziehungsweise probenbedingtes Phänomen.

A.8 *cadnano* der GATTAQUANT GmbH Referenz für 5,1 nm

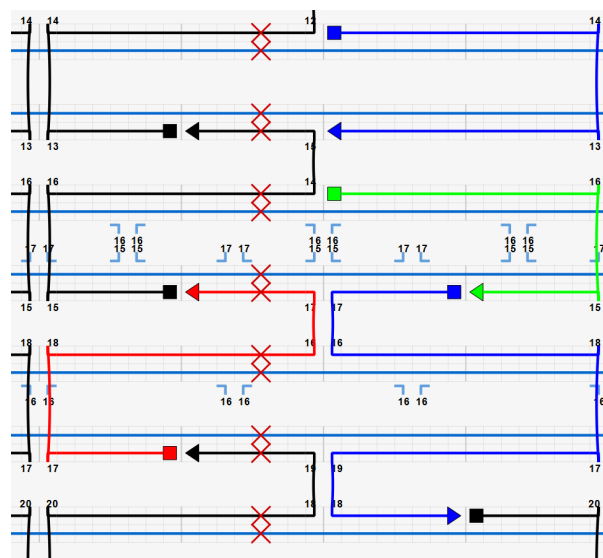


Abbildung A.6: *cadNano* Design der 5,1 nm Referenz. In rot und grün sind die Modifikationen des Akzeptors und Donors gezeigt. In blau sind die veränderten Nukleotide zur Stabilisierung der Nanostruktur gezeigt.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Darstellung des Tubulinskeletts einer menschlichen T-Lymphozyte durch indirekte Immunfluoreszenz	3
2.1	Schematische Darstellung der DNA-Doppelhelix und ihr Aufbau nach [57] .	8
2.2	Prinzip der Herstellung einer DNA-Origami Nanostruktur	10
2.3	Schematische Darstellung des HFQ-Proteins	11
2.4	Schematische Darstellung der Click-Reaktion	12
2.5	Franck Condon Prinzip	15
2.6	Jablonski Diagramm	16
2.7	Vereinfachtes Prinzip der Superauflösungsmikroskopie	19
2.8	Prinzip der Totalreflektion	21
2.9	Schematische Darstellung von DNA-PAINT nach [52]	22
2.10	Schematische Darstellung von FRET	24
2.11	Zusammenhang des Energieübertrags und des Abstands	25
2.12	Spektraler Überlapp der in dieser Arbeit genutzten Farbstoffe	26
3.1	Design des 6 nm Abstands in <i>caDNAno</i>	30
3.2	Schematische Darstellung des 6 nm Abstands	31
3.3	Schematische Darstellung des 5,9 nm Abstands	31
3.4	Schematische Darstellung des mit DNA modifizierten Proteins	34
3.5	Abmessungen des HFQ-Proteins und Immobilisierung auf einer DNA-Origami Nanostruktur	35
3.6	Darstellung der Gelelektrophorese	39
3.7	Schematische Darstellung einer vorbereiteten Oberfläche für die Messung von DNA-Origami Nanostrukturen	41
3.8	Fluoreszenzspektrum von <i>STAR RED</i>	43
3.9	Fluoreszenzspektrum von <i>ATTO[®]655</i>	44
3.10	Fluoreszenzspektren von <i>ATTO[®]542</i> und <i>STAR RED</i> . Die Absorption und Emission sind auf ihr jeweiliges Maximum normiert.	45
3.11	Fluoreszenzspektren von <i>ATTO[®]542</i> und <i>ATTO[®]647N</i>	46
3.12	Schematische Darstellung des in dieser Arbeit genutzten Aufbaus nach [11] .	47
3.13	DNA-PAINT Datenauswertung	51
3.14	Darstellung der Detektionskanäle	54
3.15	Schematische Darstellung des in dieser Arbeit genutzten konfokalen Aufbaus .	56
4.1	Rasterkraftmikroskopaufnahmen der rechteckigen DNA-Origami Nanostruktur .	66
4.2	Ergebnisse der DNA-PAINT Messung an Nanostrukturen mit einem designten Abstand von 5,9 nm zwischen dem crossover	67
4.3	Ergebnisse der DNA-PAINT Messung an Nanostrukturen mit einem designten Abstand von 6 nm	68

4.4	Ergebnisse der DNA-PAINT Messung an Nanostrukturen mit einem desig- nierten Abstand von 5,9 nm ohne crossover	69
4.5	Figure 3 aus [163]	70
4.6	AFM Nanoruler der Firma GATTAQUANT GmbH [138]	71
4.7	FRET-Spuren und deren Auswertung für einen Abstand von 5,9 nm zwischen dem crossover	72
4.8	FRET-Spuren und deren Auswertung für einen Abstand von 6 nm	73
4.9	Beispielspuren der FRET-Messung bei einem Abstand von 5,9 nm ohne crossover	74
4.10	Intensitätsspuren des <i>STAR RED</i> ohne ROXS	75
4.11	Intensitätsspuren des <i>STAR RED</i> mit ROXS	76
4.12	Mögliche Variabilität des Farbstoffs bedingt durch die Anbindesequenz . . .	79
4.13	FRET-Spuren und deren Auswertung für einen Abstand von 5,9 nm mit crossover am konfokalen Setup	81
4.14	FRET-Spuren und deren Auswertung für einen Abstand von 6 nm am konfokalen Setup	82
4.15	FRET-Spuren und deren Auswertung für einen Abstand von 5,9 nm ohne crossover am konfokalen Setup	82
4.16	E-S-Diagramm der Lösungsmessung für einen Abstand von 6 nm.	83
4.17	Schematische Darstellung der DNA-Origami Nanostrukturen mit extern angebundenem FRET-Paar	84
4.18	FRET-Effizienzen der Lösungsmessung für Abstände im Bereich von 6 nm. . . .	84
4.19	Zusammenhang der gemessenen Abstände aus FRET und Superauflösung . . .	85
4.20	Schematische Darstellung der DNA-Origami Nanostrukturen mit fest inte- griertem FRET-Paar	88
4.21	Kerndichtediagramm der FRET-Effizienz der GATTAQUANT GmbH Proben . . .	89
4.22	Histogramme der FRET-Effizienz der GATTAQUANT GmbH Proben	90
4.23	Kerndichtediagramm der FRET-Effizienz der Abstandsproben	91
4.24	Histogramme der FRET-Effizienz der Abstandsproben	92
4.25	Auftragung des berechneten FRET-Abstandes gegen den gemessenen DNA- PAINT-Abstands	93
4.26	Schematische Darstellung (A) der genutzten Nanostruktur und AFM-Ergebnisse der Bindung (B) des Proteins an das DNA-Origami mit sechs <i>caputre strands</i> . .	97
4.27	Schematische Darstellung (A) der genutzten Nanostruktur und AFM-Ergebnisse der Bindung (B) des Proteins über zwei <i>caputre strands</i>	98
4.28	Schematische Darstellung der Nanostruktur zur Prüfung der Interaktionen des Proteins	99
4.29	Ergebnisse der Negativkontrolle	99
4.30	Ergebnisse der Postivkontrolle	101
4.31	Bleichschritte in Abhängigkeit der gekoppelten Farbstoffe	102
4.32	Histogramm der analysierten Bleichschritte in Abhängigkeit der gekoppelten Farbstoffe	103
4.33	Ergebnisse der superaufgelösten Darstellung eines Proteins auf einer DNA- Origami Nanostruktur	105
4.34	Ergebnisse der superaufgelösten Darstellung eines Proteins auf einer DNA- Origami Nanostruktur	107

4.35 Dimensionen des HFQ-DNA-Komplex relativ zu den Ankerpunkten auf der Nanostruktur	109
A.1 <i>caDNA</i> no Oberfläche des in dieser Arbeit genutzten DNA-Origamis	117
A.2 Design des NRO zur Proteinbindung in <i>caDNA</i> no	118
A.3 Permission der Nutzung von Figure 3 aus [163]	131
A.4 Geradengleichung zur Bestimmung von γ und β	131
A.5 Reproduktion der Lösungsmessung	132
A.6 <i>caDNA</i> no Design der 5,1 nm Referenz	132

Tabellenverzeichnis

3.1	<i>staple strands</i> Details	29
3.2	Erwartungswerte der FRET-Messungen	61
3.3	Erwartungswerte der FRET-Messungen für <i>ATTO[®]647N</i>	62
4.1	Vergleich der Superauflösungs- und FRET-Abstände	86
4.2	Vergleich der Referenzabstände	91
4.3	Vergleich der Probenabstände	93
A.1	Sequenzen der unmodifizierten NRO-Stränge	118
A.2	Sequenzen der Biotin modifizierten Stränge	124
A.3	Sequenzen zur Protein-Immobilisierung	126
A.4	Sequenzen der Kolokalisationsstränge	127
A.5	genutzte Chemikalien	128
A.6	Zusammensetzung der genutzten Puffer	128
A.7	Rezeptur NRO	130

Literaturverzeichnis

- [1] D. Gerlach, *Geschichte der Mikroskopie*, 1. auflage Auflage, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main 2009.
- [2] C. Cremer, *Lichtmikroskopie unterhalb des Abbe-Limits. Lokalisationsmikroskopie*, Physik in unserer Zeit **42**, 21–29 (2011).
- [3] H. Mohr, *Lehrbuch der Pflanzenphysiologie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg and s.l. 1969.
- [4] P. W. Atkins und J. de Paula, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH-Lehrbuchkollektion 1, Wiley-VCH, Place of publication not identified 2014.
- [5] M. Mulisch und U. Welsch (Herausgeber), *Romeis Mikroskopische Technik*, 19. auflage Auflage, Springer Spektrum, Berlin and Heidelberg 2015.
- [6] S. W. Hell und J. Wichmann, *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*, Optics Letters **19**, 780 (1994).
- [7] E. Betzig, *Proposed method for molecular optical imaging*, Optics Letters **20**, 237 (1995).
- [8] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz und H. F. Hess, *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*, Science **313**, 1642–1645 (2006).
- [9] M. A. Thompson, M. D. Lew und W. E. Moerner, *Extending Microscopic Resolution with Single-Molecule Imaging and Active Control*, Annual Review of Biophysics **41**, 321–342 (2012).
- [10] R. Jungmann, C. Steinhauer, M. Scheible, A. Kuzyk, P. Tinnefeld und F. C. Simmel, *Single-Molecule Kinetics and Super-Resolution Microscopy by Fluorescence Imaging of Transient Binding on DNA Origami*, Nano Letters **10**, 4756–4761 (2010).
- [11] M. Raab, J. J. Schmied, I. Jusuk, C. Forthmann und P. Tinnefeld, *Fluorescence microscopy with 6 nm resolution on DNA origami*, Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry **15**, 2431–2435 (2014).
- [12] A. Bepperling, *Herstellung von Fluoreszenz-markierten Arrestin-Varianten zum Funktionsnachweis rekombinanter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren*, Naturwissenschaft, Diplom.de, Hamburg 2006.
- [13] T. Piekarski, D. Jahn und P. Tielen, *Etablierung genetischer Werkzeuge für Bakterien der Roseobacter-Gruppe*, BIOSpektrum **17**, 408–410 (2011).

- [14] J. W. Lichtman und J.-A. Conchello, *Fluorescence microscopy*, Nature Methods **2**, 910–919 (2005).
- [15] Carsten Forthmann, Jürgen Schmied, Philip Tinnefeld, *Super-auflösende Fluoreszenzmikroskopie mit einzelnen Molekülen*, LaborPraxis (S. 1–8) (2011).
- [16] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner und S. W. Hell, *Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission*, Proceedings of the National Academy of Sciences **97**, 8206–8210 (2000).
- [17] T. A. Klar und S. W. Hell, *Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy*, Optics Letters **24**, 954 (1999).
- [18] J. J. Sieber und A. Schué, *STED-Mikroskopie*, Optik & Photonik **5**, 36–39 (2010).
- [19] Nobelprize.org, *The Noble Prize in Chemistry 2014: Eric Betzig, Stefan W. Hell, William E. Moerner*, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/, abgerufen am: 18.08.2017 (2014).
- [20] L. Möckl, D. C. Lamb und C. Bräuchle, *Superhochauflösende Mikroskopie: Nobelpreis in Chemie 2014 für Eric Betzig, Stefan Hell und William E. Moerner*, Angewandte Chemie **126**, 14192–14197 (2014).
- [21] M. J. Rust, M. Bates und X. Zhuang, *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*, Nature Methods **3**, 793–796 (2006).
- [22] S. T. Hess, T. P. Girirajan und M. D. Mason, *Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy*, Biophysical Journal **91**, 4258–4272 (2006).
- [23] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld und M. Sauer, *Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes*, Angewandte Chemie International Edition **47**, 6172–6176 (2008).
- [24] S. van de Linde, I. Krstić, T. Prisner, S. Doose, M. Heilemann und M. Sauer, *Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact on super-resolution imaging*, Photochem. Photobiol. Sci. **10**, 499–506 (2011).
- [25] J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer und P. Tinnefeld, *A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes*, Angewandte Chemie (International ed. in English) **47**, 5465–5469 (2008).
- [26] C. Steinhauer, M. S. Itano und P. Tinnefeld, *Super-Resolution Fluorescence Imaging with Blink Microscopy*, in A. A. Sousa und M. J. Kruhlak (Herausgeber), *Nanoimaging*, (S. 111–129), Humana Press, Totowa, NJ (2013).
- [27] A. Sharonov und R. M. Hochstrasser, *Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes*, Proceedings of the National Academy of Sciences **103**, 18911–18916 (2006).

- [28] M. Heilemann, S. van de Linde, A. Mukherjee und M. Sauer, *Super-Resolution Imaging with Small Organic Fluorophores*, Angewandte Chemie International Edition **48**, 6903–6908 (2009).
- [29] R. Jungmann, M. S. Avendaño, J. B. Woehrstein, M. Dai, W. M. Shih und P. Yin, *Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT*, Nature Methods **11**, 313–318 (2014).
- [30] S. Farooq und J. Hohlbein, *Camera-based single-molecule FRET detection with improved time resolution*, Physical chemistry chemical physics : PCCP **17**, 27862–27872 (2015).
- [31] S. Weisenburger, D. Boening, B. Schomburg, K. Giller, S. Becker, C. Griesinger und V. Sandoghdar, *Cryogenic optical localization provides 3D protein structure data with Angstrom resolution*, Nature Methods **14**, 141–144 (2017).
- [32] D. Doenecke und P. Karlson, *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie: [Falttafel mit Stoffwechselübersicht]*, 15., komplett überarb. und neugestaltete Aufl. Auflage, Thieme, Stuttgart 2005.
- [33] J. M. Berg, J. L. Tymoczko und L. Stryer, *Biochemistry*, International edition, 5. ed., 1. print Auflage, Freeman, New York NY u.a. 2002 [erschienen 2001].
- [34] J. P. Klare, *Site-directed spin labeling EPR spectroscopy in protein research*, Biological chemistry **394**, 1281–1300 (2013).
- [35] T. W. J. Gadella (Herausgeber), *FRET and FLIM techniques*, Band 33 von *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, Elsevier, Amsterdam and London 2009.
- [36] T. Förster, *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*, Annalen der Physik **437**, 55–75 (1948).
- [37] P. R. Selvin, *The renaissance of fluorescence resonance energy transfer*, Nature structural biology **7**, 730–734 (2000).
- [38] A. R. Clapp, I. L. Medintz und H. Mattoussi, *Förster resonance energy transfer investigations using quantum-dot fluorophores*, Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry **7**, 47–57 (2006).
- [39] U. Sack, *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflussszytometrie*, S. Karger, Basel 2007.
- [40] A. K. Wozniak, G. F. Schröder, H. Grubmüller, C. A. M. Seidel und F. Oesterheld, *Single-molecule FRET measures bends and kinks in DNA*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**, 18337–18342 (2008).
- [41] F. Balzarotti, Y. Eilers, K. C. Gwosch, A. H. Gynnå, V. Westphal, F. D. Stefani, J. Elf und S. W. Hell, *Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes*, Science (New York, N.Y.) **355**, 606–612 (2017).

- [42] M. Dai, R. Jungmann und P. Yin, *Optical imaging of individual biomolecules in densely packed clusters*, Nature nanotechnology **11**, 798–807 (2016).
- [43] J. Schmied, *Testing and Pushing the Limits of Super-Resolution Microscopy*, Optik & Photonik **11**, 23–26 (2016).
- [44] T. Tørring, N. V. Voigt, J. Nangreave, H. Yan und K. V. Gothelf, *DNA origami: A quantum leap for self-assembly of complex structures*, Chemical Society Reviews **40**, 5636 (2011).
- [45] P. W. K. Rothemund, *Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns*, Nature **440**, 297–302 (2006).
- [46] J. Nangreave, D. Han, Y. Liu und H. Yan, *DNA origami: A history and current perspective*, Current opinion in chemical biology **14**, 608–615 (2010).
- [47] B. Saccà und C. M. Niemeyer, *DNA Origami: The Art of Folding DNA*, Angewandte Chemie International Edition **51**, 58–66 (2012).
- [48] C. Steinhauer, R. Jungmann, T. L. Sobey, F. C. Simmel und P. Tinnefeld, *DNA origami as a nanoscopic ruler for super-resolution microscopy*, Angewandte Chemie (International ed. in English) **48**, 8870–8873 (2009).
- [49] J. J. Schmied, M. Raab, C. Forthmann, E. Pibiri, B. Wünsch, T. Dammeyer und P. Tinnefeld, *DNA origami-based standards for quantitative fluorescence microscopy*, Nature protocols **9**, 1367–1391 (2014).
- [50] C. Vietz, B. Lalkens, G. P. Acuna und P. Tinnefeld, *Functionalizing large nanoparticles for small gaps in dimer nanoantennas*, New Journal of Physics **18**, 045012 (2016).
- [51] Jürgen Schmied, *Innovative Tools for Fluorescence Microscopy: Nanorulers: A Quick and Easy Evaluation of Optical Resolution Beyond the Limit of Diffraction* (2015).
- [52] J. Molle, M. Raab, S. Holzmeister, D. Schmitt-Monreal, D. Grohmann, Z. He und P. Tinnefeld, *Superresolution microscopy with transient binding*, Current opinion in biotechnology **39**, 8–16 (2016).
- [53] N. C. Seeman, *Structural DNA nanotechnology: an overview*, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **303**, 143–166 (2005).
- [54] P.A. Levene, *The Struktüre of Yeast Nucleic Acid: IV Ammonia Hydrolysis*, Journal of Biological Chemistry (S. 415–.) (1919).
- [55] J. D. WATSON und F. H. C. CRICK, *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*, Nature **171**, 737–738 (1953).
- [56] G. Fuchs, H. G. Schlegel und T. Eitingen (Herausgeber), *Allgemeine Mikrobiologie: 53 Tabellen*, 8., vollst. überarb. und erw. Aufl. Auflage, Thieme, Stuttgart 2007.
- [57] N. A. Campbell, *Biologie*, Band Buch & CD-ROM / Campbell von Der Bio-Trainer, 2., korrigierter nachdr Auflage, Spektrum Akadem. Verl., Heidelberg 2000.

- [58] C. F. Matta, N. Castillo und R. J. Boyd, *Extended weak bonding interactions in DNA: Pi-stacking (base-base), base-backbone, and backbone-backbone interactions*, The journal of physical chemistry. B **110**, 563–578 (2006).
- [59] P. Mignon, S. Loverix, J. Steyaert und P. Geerlings, *Influence of the pi-pi interaction on the hydrogen bonding capacity of stacked DNA/RNA bases*, Nucleic acids research **33**, 1779–1789 (2005).
- [60] J. Murken, T. Grimm und E. Holinski-Feder (Herausgeber), *Taschenlehrbuch Humangenetik*, 7., vollst. überarb. Aufl. Auflage, Thieme, Stuttgart 2006.
- [61] R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura und R. E. Dickerson, *Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA*, Nature **287**, 755–758 (1980).
- [62] J. D. Watson und M. Mörl, *Molekularbiologie*, Biologie, 6., aktualisierte Aufl., [1., dt. ausg.] Auflage, Pearson Studium, München 2011.
- [63] M. Regenass-Klotz, *Grundzüge der Gentechnik: Theorie und Praxis*, 2., erweiterte und überarbeitete Auflage Auflage, Birkhäuser Basel, Basel and s.l. 2000.
- [64] C. J. Englert, *Der CSI-Effekt in Deutschland: Die Macht des Crime-TV*, Medien • Kultur • Kommunikation, Springer VS, Wiesbaden 2014.
- [65] N. C. Seeman, *DNA in a material world*, Nature **421**, 427–431 (2003).
- [66] E. L. Wolf, *Nanophysik und Nanotechnologie: Eine Einführung in Moderne Konzepte der Nanowissenschaft*, Verdammt clever!, 1. Aufl. Auflage, Wiley-VCH, s.l. 2015.
- [67] C. Kehrt, *Mit Molekülen spielen: Wissenschaftskulturen der Nanotechnologie zwischen Politik und Medien*, Science Studies, transcript Verlag, Bielefeld 2016.
- [68] P. Wang, T. A. Meyer, V. Pan, P. K. Dutta und Y. Ke, *The Beauty and Utility of DNA Origami*, Chem **2**, 359–382 (2017).
- [69] M. Langecker, V. Arnaut, T. G. Martin, J. List, S. Renner, M. Mayer, H. Dietz und F. C. Simmel, *Synthetic lipid membrane channels formed by designed DNA nanostructures*, Science (New York, N.Y.) **338**, 932–936 (2012).
- [70] M. B. Scheible, G. Pardatscher, A. Kuzyk und F. C. Simmel, *Single molecule characterization of DNA binding and strand displacement reactions on lithographic DNA origami microarrays*, Nano Letters **14**, 1627–1633 (2014).
- [71] M. Raab, I. Jusuk, J. Molle, E. Buhr, B. Bodermann, D. Bergmann, H. Bosse und P. Tinnefeld, *Using DNA origami nanorulers as traceable distance measurement standards and nanoscopic benchmark structures*, Scientific reports **8**, 1780 (2018).
- [72] T. Gerling und H. Dietz, *Faltkunst mit DNA-Origami*, BIOSpektrum **18**, 271–274 (2012).
- [73] N. C. Seeman, *Nanomaterials based on DNA*, Annual review of biochemistry **79**, 65–87 (2010).

- [74] N. C. Seeman, *Nucleic acid junctions and lattices*, Journal of Theoretical Biology **99**, 237–247 (1982).
- [75] J. M. Jeffrey Vieira (Herausgeber), *Methods in Enzymology: Production of single-stranded plasmid DNA*, Methods in Enzymology, Elsevier 1987.
- [76] P.W.K. Rothemund, *Design of DNA Origami*, IEEE Computer Society, Washington, DC 2005.
- [77] S. M. Douglas, A. H. Marblestone, S. Teerapittayanon, A. Vazquez, G. M. Church und W. M. Shih, *Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno*, Nucleic acids research **37**, 5001–5006 (2009).
- [78] N. V. Voigt, T. Tørring, A. Rotaru, M. F. Jacobsen, J. B. Ravnsbaek, R. Subramani, W. Mamdouh, J. Kjems, A. Mokhir, F. Besenbacher und K. V. Gothelf, *Single-molecule chemical reactions on DNA origami*, Nature nanotechnology **5**, 200–203 (2010).
- [79] Lehrstuhl Mikrobiologie, Grohmann - Universität Regensburg, *Lehrstuhl Mikrobiologie, Grohmann - Universität Regensburg*, <http://www.uni-regensburg.de/biologie-vorklinische-medizin/mikrobiologie/team-leaders/grohmann/index.html>, abgerufen am: 29.08.2017 (2017).
- [80] J. T. August, L. Eoyang, M. T. de Fernandez, S. Hasegawa, C. H. Kuo, U. Rensing und L. Shapiro, *Phage-specific and host proteins in the replication of bacteriophage RNA*, Federation proceedings **29**, 1170–1175 (1970).
- [81] Y. Chao und J. Vogel, *The role of Hfq in bacterial pathogens*, Current opinion in microbiology **13**, 24–33 (2010).
- [82] T. Someya, N. Nameki und G. Kawai, *Hfq*, in W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K.-H. Cho und H. Yokota (Herausgeber), *Encyclopedia of Systems Biology*, (S. 886), Springer New York, New York, NY (2013).
- [83] J. Vogel und B. F. Luisi, *Hfq and its constellation of RNA*, Nature reviews. Microbiology **9**, 578–589 (2011).
- [84] J. S. Nielsen, A. Bøggild, C. B. F. Andersen, G. Nielsen, A. Boysen, D. E. Brodersen und P. Valentin-Hansen, *An Hfq-like protein in archaea: Crystal structure and functional characterization of the Sm protein from Methanococcus jannaschii*, RNA (New York, N.Y.) **13**, 2213–2223 (2007).
- [85] T. Lee und A. L. Feig, *The RNA binding protein Hfq interacts specifically with tRNAs*, RNA (New York, N.Y.) **14**, 514–523 (2008).
- [86] N. J. Tobias, A. K. Heinrich, H. Eresmann, P. R. Wright, N. Neubacher, R. Backofen und H. B. Bode, *Photorhabdus-nematode symbiosis is dependent on hfq-mediated regulation of secondary metabolites*, Environmental microbiology **19**, 119–129 (2017).
- [87] E. Sauer, *Special focus Hfq*, RNA biology **10**, 590–591 (2013).

- [88] D. Dimastrogiovanni, K. S. Fröhlich, K. J. Bandyra, H. A. Bruce, S. Hohensee, J. Vogel und B. F. Luisi, *Recognition of the small regulatory RNA RydC by the bacterial Hfq protein*, eLife **3** (2014).
- [89] J. M. Eeftens, J. van der Torre, D. R. Burnham und C. Dekker, *Copper-free click chemistry for attachment of biomolecules in magnetic tweezers*, BMC Biophysics **8**, 491 (2015).
- [90] H. C. Kolb, M. G. Finn und K. B. Sharpless, *Click-Chemie: Diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen*, Angewandte Chemie **113**, 2056–2075 (2001).
- [91] T. Kleine-Ostmann, *Markerfreie Analytik biologischer Moleküle: THz-Spektroskopie und Leitfähigkeitsuntersuchungen: Zugl.: Braunschweig, Techn. Univ., Diss., 2005*, 1. Aufl. Auflage, Cuvillier, Göttingen 2005.
- [92] J. Bille und W. Schlegel, *Medizinische Physik 1: Grundlagen*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg and s.l. 1999.
- [93] P. C. Heinrich, M. Müller, L. Graeve und G. Löffler (Herausgeber), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Lehrbuch, 9., vollst. überarb. Aufl. Auflage, Springer, Berlin 2014.
- [94] G. Richter, *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken ; 193 Abbildungen, 19 Tabellen*, Georg Thieme verlag, Stuttgart and New York 2003.
- [95] R. N. Irobalieva, B. Martins und O. Medalia, *Cellular structural biology as revealed by cryo-electron tomography*, Journal of cell science **129**, 469–476 (2016).
- [96] J. H. Peters und H. Baumgarten, *Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg and s.l. 1990.
- [97] W. J. Thieman und M. A. Palladino, *Biotechnologie*, Pearson Studium - Biologie, [bafög-ausg., basierend auf d. ausg. von 2007] Auflage, Pearson Studium, München 2009.
- [98] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3. ed., corr. 4. print Auflage, Springer, New York, NY 2010.
- [99] Z. Cohen (Herausgeber), *Chemicals from microalgae*, CRC Press, London 1999.
- [100] M. Born und R. Oppenheimer, *Zur Quantentheorie der Molekeln*, Annalen der Physik **389**, 457–484 (1927).
- [101] G. Wedler, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, 5., vollst. überarb. und aktualis. Aufl., 2. nachdr Auflage, Wiley-VCH, Weinheim 2010.
- [102] A. P. Thorne, U. Litzén und S. Johansson, *Spectrophysics: Principles and applications*, [3. ed.] Auflage, Springer, Berlin u.a. 1999.
- [103] Olympus, *Basic Concepts in Fluorescence* (06.02.2018).

- [104] Carsten Forthmann, *Entwicklung und Anwendung von superauflösender Fluoreszenzmikroskopie*, Dissertation, TU Braunschweig, Braunschweig (30.05.2013).
- [105] W. Demtröder, *Atoms, Molecules and Photons: An Introduction to Atomic-, Molecular- and Quantum-Physics*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2006.
- [106] P. J. Walla, *Modern biophysical chemistry: Detection and analysis of biomolecules*, Wiley-VCH-Verl., Weinheim 2009.
- [107] C. Schildknecht, *Iridium-Carben-Komplexe als Farbstoffe für tiefblaue organische Leuchtdioden: Zugl.: Braunschweig, Techn. Univ., 2006*, 1. Aufl. Auflage, Cuvillier, Göttingen 2007.
- [108] R. Kassing, *Lehrbuch der Experimentalphysik, Bd.6: Festkörper*, 2., überarb. Aufl. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin u.a. 2005.
- [109] M. Zander, *Fluorimetrie*, Band 17 von *Anleitungen für die chemische Laboratoriumspraxis*, Springer, Berlin and Heidelberg 1981.
- [110] E. Riedel, *Allgemeine und anorganische Chemie*, De-Gruyter-Lehrbuch, 9. Aufl., [aktualisiert] Auflage, De Gruyter, Berlin 2008.
- [111] E. Breitmaier und G. Jung, *Organische Chemie: Grundlagen, Stoffklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur ; zahlreiche Formeln, Tabellen*, 5., überarb. Aufl. Auflage, Thieme, Stuttgart 2005.
- [112] P. Paetzold, *Chemie: Eine Einführung*, De Gruyter, Berlin 2009.
- [113] Philip Tinnefeld, Christian Eggeling und Stefan W. Hell (Herausgeber), *Far-field optical nanoscopy*, Band 14 von *Springer series on fluorescence*, Springer, Berlin 2015.
- [114] D. S. English, E. J. Harbron und P. F. Barbara, *Probing Photoinduced Intersystem Crossing by Two-Color, Double Resonance Single Molecule Spectroscopy*, The Journal of Physical Chemistry A **104**, 9057–9061 (2000).
- [115] P. Tinnefeld, J. Hofkens, D.-P. Herten, S. Masuo, T. Vosch, M. Cotlet, S. Habuchi, K. Müllen, F. C. de Schryver und M. Sauer, *Higher-excited-state photophysical pathways in multichromophoric systems revealed by single-molecule fluorescence spectroscopy*, Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry **5**, 1786–1790 (2004).
- [116] C. E. Aitken, R. A. Marshall und J. D. Puglisi, *An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments*, Biophysical Journal **94**, 1826–1835 (2008).
- [117] X. Shi, J. Lim und T. Ha, *Acidification of the oxygen scavenging system in single-molecule fluorescence studies: In situ sensing with a ratiometric dual-emission probe*, Analytical chemistry **82**, 6132–6138 (2010).
- [118] S. van de Linde und M. Sauer, *How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching*, Chemical Society reviews **43**, 1076–1087 (2014).

- [119] E. Thiel, *Eigenschaften angeregter Rhodamin-Farbstoffe und deren Wirkung im Farbstofflaser: Zugl.: Siegen, Univ., Habil.-Schr., 1995*, Berichte aus der Physik, als ms. gedr Auflage, Shaker, Aachen 1996.
- [120] D. Cooper, H. Uhm, L. J. Tauzin, N. Poddar und C. F. Landes, *Photobleaching lifetimes of cyanine fluorophores used for single-molecule Förster resonance energy transfer in the presence of various photoprotection systems*, Chembiochem : a European journal of chemical biology **14**, 1075–1080 (2013).
- [121] ScienceBlog.at, *Superauflösende Mikroskopie zeigt Aufbau und Dynamik der Bausteine in lebenden Zellen*, http://scienceblog.at/superaufl%C3%B6sende-mikroskopie#.WZ_TcD5JaM8, abgerufen am: 28.08.2017 (04.09.2015).
- [122] E. Abbe, *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*, Archiv für Mikroskopische Anatomie **9**, 413–418 (1873).
- [123] Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature, *Beyond the diffraction limit*, Nature Photonics **3**, 361 (2009).
- [124] L. O. Björn (Herausgeber), *Photobiology: The Science of Life and Light*, second edition Auflage, Springer Science+Business Media LLC, New York, NY 2008.
- [125] K. Nienhaus und G. U. Nienhaus, *Where Do We Stand with Super-Resolution Optical Microscopy?*, Journal of molecular biology **428**, 308–322 (2016).
- [126] G. Cox, *Optical imaging techniques in cell biology*, 2. ed. Auflage, CRC Press, Boca Raton, Fla. 2012.
- [127] Moritz Ruben Medart, *Etablierung von Photoaktivierter Lokalisations- und Stochastischer Optischer Rekonstruktionsmikroskopie und Anwendung an zytotoxischen T-Lymphozyten und Chromaffinzellen der Nebenniere*, Dissertation, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar (2012).
- [128] B. R. Masters und P. T. C. So (Herausgeber), *Handbook of biomedical nonlinear optical microscopy*, Oxford University Press, Oxford and New York 2008.
- [129] L. Haag, *Laserinduzierte Plasmaspektroskopie und -mikroskopie mit Femtosekunden-Einzel- und Doppelpulsen: Zugl.: Kassel, Univ., Diss., 2010*, Kassel University Press, Kassel 2010.
- [130] B. Alberts, U. Schäfer und B. Häcker (Herausgeber), *Molekularbiologie der Zelle*, 5. aufl. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim 2011.
- [131] B. Huang, M. Bates und X. Zhuang, *Super-resolution fluorescence microscopy*, Annual review of biochemistry **78**, 993–1016 (2009).
- [132] C. Steinhauer, C. Forthmann, J. Vogelsang und P. Tinnefeld, *Superresolution microscopy on the basis of engineered dark states*, Journal of the American Chemical Society **130**, 16840–16841 (2008).
- [133] A. Auer, M. T. Strauss, T. Schlichthaerle und R. Jungmann, *Fast, Background-Free DNA-PAINT Imaging Using FRET-Based Probes*, Nano Letters **17**, 6428–6434 (2017).

- [134] C. A. M. Seidel, A. Schulz und M. H. M. Sauer, *Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies*, The Journal of Physical Chemistry **100**, 5541–5553 (1996).
- [135] J. B. Pawley (Herausgeber), *Handbook of biological confocal microscopy*, 3. ed. Auflage, Springer, New York, NY 2006.
- [136] G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates und X. Zhuang, *Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging*, Nature Methods **8**, 1027–1036 (2011).
- [137] S. H. Lee, M. Baday, M. Tjioe, P. D. Simonson, R. Zhang, E. Cai und P. R. Selvin, *Using fixed fiduciary markers for stage drift correction*, Optics express **20**, 12177–12183 (2012).
- [138] Gattaquant DNA Nanotechnologies, *Gattaquant DNA Nanotechnologies*, <http://www.gattaquant.com/de>, abgerufen am: 28.08.2017 (2014).
- [139] P. D. Simonson, E. Rothenberg und P. R. Selvin, *Single-molecule-based super-resolution images in the presence of multiple fluorophores*, Nano Letters **11**, 5090–5096 (2011).
- [140] J. Schnitzbauer, M. T. Strauss, T. Schlichthaerle, F. Schueder und R. Jungmann, *Super-resolution microscopy with DNA-PAINT*, Nature protocols **12**, 1198–1228 (2017).
- [141] B. J. Beliveau, E. F. Joyce, N. Apostolopoulos, F. Yilmaz, C. Y. Fonseka, R. B. McCole, Y. Chang, J. B. Li, T. N. Senaratne, B. R. Williams, J.-M. Rouillard und C.-t. Wu, *Versatile design and synthesis platform for visualizing genomes with Oligopaint FISH probes*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**, 21301–21306 (2012).
- [142] T. Kiuchi, M. Higuchi, A. Takamura, M. Maruoka und N. Watanabe, *Multitarget super-resolution microscopy with high-density labeling by exchangeable probes*, Nature Methods **12**, 743–746 (2015).
- [143] F. Chen, P. W. Tillberg und E. S. Boyden, *Optical imaging. Expansion microscopy*, Science (New York, N.Y.) **347**, 543–548 (2015).
- [144] E. A. Jares-Erijman und T. M. Jovin, *FRET imaging*, Nature biotechnology **21**, 1387–1395 (2003).
- [145] Sarah Schulz, *Konformationelle Änderung der archaeellen RNA Polymerase während des Transkriptionszyklus*, Dissertation, TU Braunschweig, Braunschweig (29.06.2016).
- [146] U. Kubitscheck (Herausgeber), *Fluorescence microscopy: From principles to biological applications*, second edition Auflage, Wiley-VCH, Weinheim 2017.
- [147] C. Berney und G. Danuser, *FRET or No FRET: A Quantitative Comparison*, Biophysical Journal **84**, 3992–4010 (2003).

- [148] P. Tinnefeld und M. Sauer, *Branching out of single-molecule fluorescence spectroscopy: Challenges for chemistry and influence on biology*, Angewandte Chemie International Edition **44**, 2642–2671 (2005).
- [149] ATTO-TEC GmbH, *R(0)-Values (FRET): ATTO-TEC GmbH*, <http://www.atto-tec.com/index.php?id=65&L=1>, abgerufen am: 13.10.2017 (1999).
- [150] I. Medintz und N. Hildebrandt, *FRET - Förster Resonance Energy Transfer*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany 2013.
- [151] M. A. Karymov, M. Chinnaraj, A. Bogdanov, A. R. Srinivasan, G. Zheng, W. K. Olson und Y. L. Lyubchenko, *Structure, dynamics, and branch migration of a DNA Holliday junction: A single-molecule fluorescence and modeling study*, Biophysical Journal **95**, 4372–4383 (2008).
- [152] S. Schulz, A. Gietl, K. Smollett, P. Tinnefeld, F. Werner und D. Grohmann, *TFE and Spt4/5 open and close the RNA polymerase clamp during the transcription cycle*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **113**, E1816–25 (2016).
- [153] R. E. Dale, J. Eisinger und W. E. Blumberg, *The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer*, Biophysical Journal **26**, 161–193 (1979).
- [154] D. W. Piston und G.-J. Kremers, *Fluorescent protein FRET: The good, the bad and the ugly*, Trends in biochemical sciences **32**, 407–414 (2007).
- [155] A. N. Kapanidis, N. K. Lee, T. A. Laurence, S. Doose, E. Margeat und S. Weiss, *Fluorescence-aided molecule sorting: Analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules*, Proceedings of the National Academy of Sciences **101**, 8936–8941 (2004).
- [156] A. Ingargiola, *Applying Corrections in Single-Molecule FRET*, bioRxiv 2016.
- [157] N. K. Lee, A. N. Kapanidis, Y. Wang, X. Michalet, J. Mukhopadhyay, R. H. Ebricht und S. Weiss, *Accurate FRET measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation*, Biophysical Journal **88**, 2939–2953 (2005).
- [158] S. M. Müller, H. Galliardt, J. Schneider, B. G. Barisas und T. Seidel, *Quantification of Förster resonance energy transfer by monitoring sensitized emission in living plant cells*, Frontiers in plant science **4**, 413 (2013).
- [159] J. van Rheenen, M. Langeslag und K. Jalink, *Correcting Confocal Acquisition to Optimize Imaging of Fluorescence Resonance Energy Transfer by Sensitized Emission*, Biophysical Journal **86**, 2517–2529 (2004).
- [160] J. J. McCann, U. B. Choi, L. Zheng, K. Weninger und M. E. Bowen, *Optimizing methods to recover absolute FRET efficiency from immobilized single molecules*, Biophysical Journal **99**, 961–970 (2010).
- [161] Cadnano, *Cadnano*, <http://cadnano.org/>, abgerufen am: 13.10.2017 (20.09.2017).

- [162] R. Erbrecht, *Das große Tafelwerk interaktiv: Ein Tabellen- und Formelwerk für den mathematisch-naturwissenschaftlichen Unterricht in den Sekundarstufen I und II ; [Mathematik, Informatik, Astronomie, Physik, Chemie, Biologie ; für das Abitur empfohlen]*, 1. Aufl., 15. dr Auflage, Cornelsen, Berlin 2011.
- [163] X.-C. Bai, T. G. Martin, S. H. W. Scheres und H. Dietz, *Cryo-EM structure of a 3D DNA-origami object*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**, 20012–20017 (2012).
- [164] M. Dai, *DNA-PAINT Super-Resolution Imaging for Nucleic Acid Nanostructures*, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **1500**, 185–202 (2017).
- [165] R. Hatzenpichler, S. Scheller, P. L. Tavormina, B. M. Babin, D. A. Tirrell und V. J. Orphan, *In situ visualization of newly synthesized proteins in environmental microbes using amino acid tagging and click chemistry*, Environmental microbiology **16**, 2568–2590 (2014).
- [166] C. Yanisch-Perron, J. Vieira und J. Messing, *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors*, Gene **33**, 103–119 (1985).
- [167] A. POLSON, G. M. POTGIETER, J. F. LARGIER, G. E. MEARS und F. J. JOUBERT, *THE FRACTIONATION OF PROTEIN MIXTURES BY LINEAR POLYMERS OF HIGH MOLECULAR WEIGHT*, Biochimica et biophysica acta **82**, 463–475 (1964).
- [168] S. Galiani, D. Waithe, K. Reglinski, L. D. Cruz-Zaragoza, E. Garcia, M. P. Clausen, W. Schliebs, R. Erdmann und C. Eggeling, *Super-resolution Microscopy Reveals Compartmentalization of Peroxisomal Membrane Proteins*, Journal of Biological Chemistry **291**, 16948–16962 (2016).
- [169] Abberior, *Abberior STAR RED*, <http://www.abberior.com/shop/Labels-by-Application/Confocal-Epi-SIM/Abberior-STAR-RED::10.html>, abgerufen am: 30.08.2017 (2006).
- [170] I. Jusuk, C. Vietz, M. Raab, T. Dammeyer und P. Tinnefeld, *Super-Resolution Imaging Conditions for enhanced Yellow Fluorescent Protein (eYFP) Demonstrated on DNA Origami Nanorulers*, Scientific reports **5**, 14075 (2015).
- [171] ATTO-TEC GmbH, *ATTO 655*, http://www.atto-tec.com/attotecshop/product_info.php?info=p115_atto-655.html, abgerufen am: 30.08.2017 (2006).
- [172] ATTO-TEC GmbH, *ATTO 542*, https://www.atto-tec.com/attotecshop/product_info.php?info=p145_atto-542.html, abgerufen am: 30.08.2017 (2006).
- [173] E. Pibiri, P. Holzmeister, B. Lalkens, G. P. Acuna und P. Tinnefeld, *Single-Molecule Positioning in Zeromode Waveguides by DNA Origami Nanoadapters*, Nano Letters **14**, 3499–3503 (2014).

- [174] C. Vietz, B. Lalkens, G. P. Acuna und P. Tinnefeld, *Synergistic Combination of Unquenching and Plasmonic Fluorescence Enhancement in Fluorogenic Nucleic Acid Hybridization Probes*, Nano Letters **17**, 6496–6500 (2017).
- [175] S. Isbaner, N. Karedla, I. Kaminska, D. Ruhlandt, M. Raab, J. Bohlen, A. Chizhik, I. Gregor, P. Tinnefeld, J. Enderlein und R. Tsukanov, *Axial Colocalization of Single Molecules with Nanometer Accuracy Using Metal-Induced Energy Transfer*, Nano Letters **18**, 2616–2622 (2018).
- [176] ATTO-TEC GmbH, *ATTO 647N*, http://www.atto-tec.com/attotecshop/product_info.php?info=p114_atto-647n.html, abgerufen am: 12.04.2018 (2006).
- [177] C Micheal Stanley, *Filters and mirrors for laser applications*, Nature Methods (S. 12–13) (2008).
- [178] A. E. Knight, *Single-molecule fluorescence imaging by total internal reflection fluorescence microscopy (IUPAC Technical Report)*, Pure and Applied Chemistry **86** (2014).
- [179] AHF analysetechnik AG, *AHF Analysetechnik Laser-Strahlenteiler zt 647 rdc flat*, https://www.ahf.de/art-TIRF_Beamsplitter_zt_647_rdc;F48-649.html, abgerufen am: 18.08.2017 (2006).
- [180] QImaging, *Electron-Multiplying (EM) Gain*, https://www.qimaging.com/resources/pdfs/emccd_technote.pdf, aufgerufen am: 18.08.2017 (2013).
- [181] M. Raab, C. Vietz, F. D. Stefani, G. P. Acuna und P. Tinnefeld, *Shifting molecular localization by plasmonic coupling in a single-molecule mirage*, Nature communications **8**, 13966 (2017).
- [182] Y. Santoso, L. C. Hwang, L. Le Reste und A. N. Kapanidis, *Red light, green light: Probing single molecules using alternating-laser excitation*, Biochemical Society transactions **36**, 738–744 (2008).
- [183] D. Wang, C. Vietz, T. Schröder, G. Acuna, B. Lalkens und P. Tinnefeld, *A DNA Walker as a Fluorescence Signal Amplifier*, Nano Letters **17**, 5368–5374 (2017).
- [184] J. Ross, P. Buschkamp, D. Fetting, A. Donnermeyer, C. M. Roth und P. Tinnefeld, *Multicolor single-molecule spectroscopy with alternating laser excitation for the investigation of interactions and dynamics*, The journal of physical chemistry. B **111**, 321–326 (2007).
- [185] T. Hellmuth, *Neuere Methoden in der konfokalen Mikroskopie*, Physik Journal **49**, 489–491 (1993).
- [186] P. J. Walla, *Modern Biophysical Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany 2014.
- [187] A. Hoppe, K. Christensen und J. A. Swanson, *Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Stoichiometry in Living Cells*, Biophysical Journal **83**, 3652–3664 (2002).

- [188] B. Hellenkamp, S. Schmid und O. Doroshenko, *Precision and accuracy of single-molecule FRET measurements - a worldwide benchmark study* (03.01.2018).
- [189] OriginLab Corporation, *ORIGIN: Software für Datenanalyse und -visualisierung*, <http://www.originlab.de/Origin>, abgerufen am: 30.09.2017 (2016).
- [190] JPK Instruments, *Tutorials - Atomic Force Microscopy (AFM): What is Atomic Force Microscopy*, *Tutorials-AtomicForceMicroscopy(AFM)*, abgerufen am: 18.08.2017 (2012).
- [191] Y. Dahman, *Nanotechnology and Functional Materials for Engineers*, Micro and Nano Technologies, Elsevier Science, Philadelphia 2017.
- [192] B. Eichman, *DNA Repair Enzymes*, Band v. Volume 592 von *Methods in Enzymology*, Elsevier Science, Saint Louis 2017.
- [193] O. Piétrement, D. Pastré, S. Fusil, J. Jeusset, M.-O. David, F. Landousy, L. Hamon, A. Zozime und E. Le Cam, *Reversible Binding of DNA on NiCl₂ 2 -Treated Mica by Varying the Ionic Strength*, *Langmuir* **19**, 2536–2539 (2003).
- [194] R. Knippers, *Molekulare Genetik: 68 Tabellen*, 9., komplett überarb. Aufl. Auflage, Thieme, Stuttgart 2006.
- [195] S. Choudhuri, *Fundamentals of Genes and Genomes*, in S. Choudhuri (Herausgeber), *Bioinformatics for beginners*, (S. 1–25), Elsevier, Amsterdam (2014).
- [196] A. Ikai und C. Heinisch, *Einführung in die Nanobiomechanik: Bildgebung und Messung durch Rasterkraftmikroskopie*, Wiley, Somerset 2012.
- [197] H. Brederick, E. Müller und H. Meier, *Die Photochemie der Organischen Farbstoffe*, Band 7, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 1963.
- [198] F. Marlow, K. Hoffmann und J. Caro, *Photoinduced switching in nanocomposites of azobenzene and molecular sieves*, *Advanced Materials* **9**, 567–570 (1997).
- [199] I. H. Stein, V. Schüller, P. Böhm, P. Tinnefeld und T. Liedl, *Single-molecule FRET ruler based on rigid DNA origami blocks*, *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* **12**, 689–695 (2011).
- [200] P. Selényi, *Wide-Angle Interferences and the Nature of the Elementary Light Sources*, *Physical Review* **56**, 477–479 (1939).
- [201] C. P. Toseland, *Fluorescent labeling and modification of proteins*, *Journal of chemical biology* **6**, 85–95 (2013).
- [202] C. A. Wurm, K. Kolmakov, F. Göttfert, H. Ta, M. Bossi, H. Schill, S. Berning, S. Jakobs, G. Donnert, V. N. Belov und S. W. Hell, *Novel red fluorophores with superior performance in STED microscopy*, *Optical Nanoscopy* **1**, 7 (2012).
- [203] U. Wollenberger, R. Renneberg, F. F. Bier und F. W. Scheller, *Analytische Biochemie*, John Wiley & Sons, Hoboken 2012.

- [204] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer und G. J. Gatto, *Biochemie*, 7. auflage Auflage, Springer Spektrum, Berlin 2013.
- [205] N. Di Fiori und A. Meller, *The Effect of dye-dye interactions on the spatial resolution of single-molecule FRET measurements in nucleic acids*, Biophysical Journal **98**, 2265–2272 (2010).
- [206] L. M. Hall, M. Gerowska und T. Brown, *A highly fluorescent DNA toolkit: Synthesis and properties of oligonucleotides containing new Cy3, Cy5 and Cy3B monomers*, Nucleic acids research **40**, e108 (2012).
- [207] A. Gust, A. Zander, A. Gietl, P. Holzmeister, S. Schulz, B. Lalkens, P. Tinnefeld und D. Grohmann, *A Starting Point for Fluorescence-Based Single-Molecule Measurements in Biomolecular Research*, Molecules **19**, 15824–15865 (2014).
- [208] P. Carlo, A. Martelli und F. A. Bignone, *Effetto del trattamento con Triton X-100 sull'integrità del DNA e sul rapporto DNA:RNA:proteine di nuclei di fegato di ratto*, Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale **57**, 2203–2208 (1981).
- [209] B. Lindman und R. Dias, *DNA interactions with polymers and surfactants*, Wiley 2008.
- [210] C. Timm und C. M. Niemeyer, *Assembly and purification of enzyme-functionalized DNA origami structures*, Angewandte Chemie (International ed. in English) **54**, 6745–6750 (2015).
- [211] ATTO-TEC GmbH, *ATTO-TEC GmbH - ATTO 647*, https://www.atto-tec.com/attotecshop/product_info.php?info=p113_atto-647.html, abgerufen am: 21.10.2017 (2006).
- [212] C. Gerthsen und H. O. Kneser, *Physik: Ein Lehrbuch zum Gebrauch Neben Vorlesungen*, neunte auflage Auflage, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg and s.l. 1966.
- [213] B. Barlag, O. Beutel, D. Janning, F. Czarniak, C. P. Richter, C. Kommnick, V. Göser, R. Kurre, F. Fabiani, M. Erhardt, J. Piehler und M. Hensel, *Single molecule super-resolution imaging of proteins in living Salmonella enterica using self-labelling enzymes*, Scientific reports **6**, 31601 (2016).
- [214] M. Sevvana, V. Vijayan, M. Zweckstetter, S. Reinelt, D. R. Madden, R. Herbst-Irmer, G. M. Sheldrick, M. Bott, C. Griesinger und S. Becker, *A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA*, Journal of molecular biology **377**, 512–523 (2008).
- [215] G. Y. Shevelev, O. A. Krumkacheva, A. A. Lomzov, A. A. Kuzhelev, D. V. Trukhin, O. Y. Rogozhnikova, V. M. Tormyshev, D. V. Pyshnyi, M. V. Fedin und E. G. Bagryanskaya, *Triarylmethyl Labels: Toward Improving the Accuracy of EPR Nanoscale Distance Measurements in DNAs*, The journal of physical chemistry. B **119**, 13641–13648 (2015).

- [216] J. W. Taraska, M. C. Puljung, N. B. Olivier, G. E. Flynn und W. N. Zagotta, *Mapping the structure and conformational movements of proteins with transition metal ion FRET*, Nature Methods **6**, 532–537 (2009).
- [217] M. Schorb und J. A. G. Briggs, *Correlated cryo-fluorescence and cryo-electron microscopy with high spatial precision and improved sensitivity*, Ultramicroscopy **143**, 24–32 (2014).
- [218] W. Kukulski, M. Schorb, S. Welsch, A. Picco, M. Kaksonen und J. A. G. Briggs, *Correlated fluorescence and 3D electron microscopy with high sensitivity and spatial precision*, The Journal of cell biology **192**, 111–119 (2011).
- [219] B. Liu, Y. Xue, W. Zhao, Y. Chen, C. Fan, L. Gu, Y. Zhang, X. Zhang, L. Sun, X. Huang, W. Ding, F. Sun, W. Ji und T. Xu, *Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context*, Scientific reports **5**, 13017 (2015).
- [220] R. Kaufmann, C. Hagen und K. Grünewald, *Fluorescence cryo-microscopy: Current challenges and prospects*, Current opinion in chemical biology **20**, 86–91 (2014).
- [221] G. Wolff, C. Hagen, K. Grünewald und R. Kaufmann, *Towards correlative super-resolution fluorescence and electron cryo-microscopy*, Biology of the cell **108**, 245–258 (2016).
- [222] T. M. Creemers, A. J. Lock, V. Subramaniam, T. M. Jovin und S. Völker, *Photophysics and optical switching in green fluorescent protein mutants*, Proceedings of the National Academy of Sciences **97**, 2974–2978 (2000).
- [223] A. R. Faro, V. Adam, P. Carpentier, C. Darnault, D. Bourgeois und E. de Rosny, *Low-temperature switching by photoinduced protonation in photochromic fluorescent proteins*, Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology **9**, 254–262 (2010).
- [224] Y.-W. Chang, S. Chen, E. I. Tocheva, A. Treuner-Lange, S. Löbach, L. Søgaaard-Andersen und G. J. Jensen, *Correlated cryogenic photoactivated localization microscopy and cryo-electron tomography*, Nature Methods **11**, 737–739 (2014).
- [225] Nobelprize.org, *The Nobel Prize in Chemistry 2017*, https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2017/, abgerufen am: 30.10.2017 (2017).
- [226] A. P. Demchenko (Herausgeber), *Introduction to Fluorescence Sensing*, Springer Netherlands, Dordrecht 2009.
- [227] M. Y. Berezin und S. Achilefu, *Fluorescence lifetime measurements and biological imaging*, Chemical reviews **110**, 2641–2684 (2010).
- [228] J. Lee, S. Park, W. Kang und S. Hohng, *Accelerated super-resolution imaging with FRET-PAINT*, Molecular brain **10**, 63 (2017).

-
- [229] I. Medintz und N. Hildebrandt (Herausgeber), *FRET - Förster Resonance Energy Transfer: From theory to applications*, Wiley-VCH, Weinheim 2013.
- [230] S. J. T. U. Press, D. Xing, Y. Li, Z. Huang und Z. Zhang, *Advances in Molecular Biophotonics*, Band 5 von *Advances in Optical Physics*, De Gruyter, Berlin, Boston 2017.
- [231] S. A. Díaz, S. Buckhout-White, M. G. Ancona, C. M. Spillmann, E. R. Goldman, J. S. Melinger und I. L. Medintz, *Extending DNA-Based Molecular Photonic Wires with Homogeneous Förster Resonance Energy Transfer*, *Advanced Optical Materials* **4**, 399–412 (2016).
- [232] J. J. Schmied, C. Forthmann, E. Pibiri, B. Lalkens, P. Nickels, T. Liedl und P. Tinnefeld, *DNA Origami Nanopillars as Standards for Three-Dimensional Superresolution Microscopy*, *Nano Letters* **13**, 781–785 (2013).
- [233] P. C. Nickels, B. Wünsch, P. Holzmeister, W. Bae, L. M. Kneer, D. Grohmann, P. Tinnefeld und T. Liedl, *Molecular force spectroscopy with a DNA origami-based nanoscopic force clamp*, *Science (New York, N.Y.)* **354**, 305–307 (2016).
- [234] C. Lorenz, T. Gesell, B. Zimmermann, U. Schoeberl, I. Bilusic, L. Rajkowitsch, C. Waldsich, A. von Haeseler und R. Schroeder, *Genomic SELEX for Hfq-binding RNAs identifies genomic aptamers predominantly in antisense transcripts*, *Nucleic acids research* **38**, 3794–3808 (2010).
- [235] J. Brglez, P. Nikolov, A. Angelin und C. M. Niemeyer, *Designed Intercalators for Modification of DNA Origami Surface Properties*, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **21**, 9440–9446 (2015).

Danksagung

Ohne Andi Gietl wäre diese Arbeit niemals entstanden. Du bist 2016 im entscheidenden Zeitraum zum Institut zurückgekommen, hast mich in dieser Zeit betreut, mir unter die Arme gegriffen und gezeigt, dass mit kleinen Hilfen und Ideen großes geschafft werden kann. Du hast mir gezeigt, dass Wissenschaft schön und erfolgreich sein kann. Ich bin Dir unendlich dankbar dafür, dass ich Dich drei Monate kennenlernen durfte und Du mir so viel gegeben hast. Es wäre erheblich leichter gefallen, wenn Du bis zum Ende hättest bleiben können. Doch das Leben schreibt seine eigenen Geschichten.

Diese Dissertation wurde am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie (PCI) an der Technischen Universität Braunschweig angefertigt. Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Philip Tinnefeld, Herrn Prof. Dr. Christoph Jacob und Frau Prof. Dr. Petra Mischnick für die Übernahme der Referate als auch Frau Prof. Dr. Dina Grohmann für die Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei der Braunschweig International School of Metrology (B-IGSM) und dem GrK 1952/1 Metrology for Complex Nanosystems (Nanomet) für die zahlreichen Kontakte, Field-Trips, Workshops, Summer Schools und Plenary Meetings sowie die Außer-Universitären gemeinsamen Unternehmungen. Außerordentlich dankbar bin ich Prof. Meinhard Schilling, Dr. Rainer Stosch, der PTB Braunschweig und Judith Krakowski für die Befürwortung meiner Arbeit und das immer offene Ohr.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank Frau Talk für die gute Organisation im Institut sowie meinen Kollegen Bettina, Rainer, Johann, Kristina, Carsten und Simeon für die Unterstützung und Erleichterung im wissenschaftlichen Alltag. Außerdem danke ich herzlich Tim und Sabine für die tolle Atmosphäre im Büro und deren Unterstützung mit Rat und Tat während meiner Tätigkeit.

Unbeschreiblich und aus tiefstem Herzen dankbar bin ich meinen Eltern, meinem Verlobten und meinen Freunden, den bekannten als auch den neu dazu gewonnen, für ihr Verständnis, ihre Zurücknahme, Unterstützung, Erdung, Präsenz und Distanz über diese Jahre.

Julia Molle

Lebenslauf

"Das Leben ist wie Zeichnen ohne Radiergummi"

Persönliche Daten

Geburtstag: 15.02.1990
Geburtsort: Salzgitter
Familienstand: ledig

akademische Laufbahn

2014–heute **TU Braunschweig**, *wissenschaftliche Mitarbeiterin*, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie.
2012–2014 **TU Braunschweig**, *Masterstudium der Biotechnologie mit Vertiefung im verfahrenstechnischen Bereich*.
Abschluss: Master of Science mit der Endnote 1,9
2009–2012 **TU Braunschweig**, *Bachelorstudium der Biotechnologie mit Vertiefung im verfahrenstechnischen Bereich*.
Abschluss: Bachelor of Science mit der Endnote 2,3

Arbeitserfahrung

2018–heute **Physikalisch Technische Bundesanstalt Braunschweig**, *Doktorandin*, Fachbereich 3.1, Allgemeine und Anorganische Chemie.
2014–2018 **TU Braunschweig**, *wissenschaftliche Mitarbeiterin*, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie.